

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Μελέτη επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού
γάλακτος σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε
ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926**

**Effect of goat whey protein on oxidative stress markers
in endothelial cells EA.hy926**

Πτυχιακή Εργασία

Μπρέγκου Ερίντα

-

Λάρισα 2014

**Μελέτη επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος
σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα
EA.hy926**

Effects of goat whey protein on oxidative stress markers in
endothelial cells EA.hy926

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Άννα Μαρία Ψαρρά: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η διπλωματική αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε χάρη στη συμβολή κάποιων ανθρώπων τους οποίους επιθυμώ να ευχαριστήσω.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου μου δόθηκε η ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα και να αποκομίσω πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Λέκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για όλη την βοήθεια που μου πρόσφερε κατά την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου άσκησης.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη εκ μέρους μου να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό και συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε κατά την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων. Ιδιαίτερα, όμως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην διδάκτορα Θάλεια Κερασιώτη για την βοήθεια της, τις πολύτιμες συμβουλές της και για την στήριξη όποτε την χρειάστηκα.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα Εικόνων.....	7
Περιεχόμενα Πινάκων & Γραφημάτων.....	8
ABSTRACT.....	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 Ελεύθερες Ρίζες	13
1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	14
1.2.1. Πηγές Δραστικών Μορφών Οξυγόνου	16
1.2.1.α Ενδοκυτταρικές πηγές.....	16
1.2.1.β Εξωκυτταρικές πηγές.....	20
1.3 Βιολογική Δράση Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου.....	21
1.3.1 Θετικές Δράσεις.....	21
1.3.2. Επιβλαβείς Δράσεις	22
1.4 Αντιοξειδωτικοί Κυτταρικοί Μηχανισμοί.....	26
1.4.α Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί.....	27
1.4.β Μη Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί.....	29
1.5.1 Οι επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες	36
1.6 Η Πρωτεΐνη Ορού Γάλακτος (Cheese – Whey Protein).....	37
1.6.1 Παρασκευή Πρωτεΐνης Ορού Γάλακτος.....	39
2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	40
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	41
3.1.1 Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος.....	41
3.1.2 Τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (t-BOOH).....	42
3.1.3 Κυτταρική σειρά EA.hy926.....	44
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
3.2.1 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy 926	45
3.2.2 Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού των δεικτών του οξειδωτικού στρες μετά την χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος (Whey protein) και του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.	45
3.2.3 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά.....	47
3.2.3.α Αρχή της μεθόδου.....	47

3.2.3.β Πειραματικό πρωτόκολλο.....	48
3.2.3.γ Υπολογισμοί.....	49
3.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά.....	50
3.2.4.α Αρχή της μεθόδου.....	50
3.2.4.β Πειραματικό πρωτόκολλο.....	50
3.2.4.γ Υπολογισμοί.....	51
3.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά.....	51
3.2.5.α Αρχή της μεθόδου.....	51
3.2.5.β Πειραματικό πρωτόκολλο.....	52
3.2.5.γ Υπολογισμοί.....	52
3.2.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά.....	53
3.2.6.α Αρχή της μεθόδου.....	53
3.2.6.β Πειραματικό πρωτόκολλο.....	54
3.2.6.γ Υπολογισμοί.....	55
3.2.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστήριου Bradford	55
3.2.8 Στατιστική ανάλυση	56
4. Αποτελέσματα.....	57
4.1 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά.....	57
4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά.....	58
.....	58
4.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά.....	59
4.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά.....	60
4.Συζήτηση	60
Βιβλιογραφία.....	67

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Βλάβες των βιολογικών μορίων λόγω δράσης ελεύθερων ριζών

Εικόνα 2: Αναπνευστική Αλυσίδα

Εικόνα 3: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Εικόνα 4: Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στο DNA

Εικόνα 5: Πορεία πρωτεϊνικής οξειδωσης

Εικόνα 6: Πορεία λιπιδικής υπεροξειδωσης

Εικόνα 7: Απεικόνιση της δράσης της Υπεροξειδικής Δισμουτάσης (**SOD**), της Καταλάσης (**CAT**), της Αναγωγάσης της Γλουταθειόνης (**GR**) και της Υπεροξειδάσης της Γλουταθειόνης (**GPX**).

Εικόνα 8: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

Εικόνες 9: Παραγωγή ουρικού οξέος

Εικόνα 10: Οξειδωτικό Στρες

Εικόνα 11: Εξωκυττάρια και Ενδοκυττάρια πηγές οξειδωτικού στρες

Εικόνα 12: Σύνθεση της γλουταθειόνης

Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

Εικόνα 14: Κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926

Εικόνα 15: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στα επίπεδα της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επωάζονται για 24h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του t-BOOH. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

Εικόνα 16: Αντίδραση αναγωγής της ρίζας DPPH με αντιοξειδωτικό

Εικόνα 17: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

Εικόνα 18: Σύνδεση πρωτεΐνης με DNPH και σχηματισμός υδραζονίου

Περιεχόμενα Πινάκων & Γραφημάτων

Πίνακας 1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου σε Βιολογικά Συστήματα

Πίνακας 1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου σε Βιολογικά Συστήματα

Γράφημα 1: Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0,3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (0,3 mM) για 30 min. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

Γράφημα 2: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0,3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (0,3 mM) για 30 min. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

Γράφημα 3: Επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0,3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (0,3 mM) για 30 min. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

Γράφημα 4: Επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ως προς τα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 σε όλα τα δείγματα.

Γράφημα 5: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0,3 mM) για 1h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) για 24h + t-BOOH (0,3 mM) για 30 min. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι δραστικές ρίζες, αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διττό ρόλο, άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων καθώς και στη διεργασία γήρανσης, με αποτέλεσμα να καθίσταται αναγκαία η εύρεση νέων αντιοξειδωτικών ουσιών, που θα μπορούν να λαμβάνονται ως συμπληρώματα διατροφής ασκώντας προστατευτική δράση.

Έτσι, λοιπόν, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε ενδοθηλιακά κύτταρα (κυτταρική σειρά EA.hy926), όπου προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) καθώς και τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC). Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες σε κύτταρα που επωάστηκαν με τις 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) πρωτεΐνης ορού γάλακτος για 1 ώρα και στην συνέχεια τους χορηγήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH (tert-Butyl Hydroperoxide) (0,3 mM). Από την μελέτη μας προέκυψε ότι ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH μείωσε τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και της ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των αναφερόμενων δεικτών σε σχέση με τα επίπεδά τους στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH. Από την άλλη, ο αυξητικός παράγοντας t-BOOH αύξησε τα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που είχε χορηγηθεί πρωτεΐνη ορού γάλακτος τα επίπεδα των εν λόγω δεικτών μειώθηκαν σε σχέση με τα επίπεδά τους στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH.

Τα αποτελέσματα, λοιπόν, έδειξαν ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος έχει αντιοξειδωτική δράση, ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου ασκείται αυτή η δράση.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are products of natural cellular metabolism and play a dual role; sometimes beneficial for cells and organisms and other times harmful. Oxidative stress reflects an imbalance between pro-oxidant and antioxidant cellular substances, due to either high production of free oxygen radicals or cellular antioxidant mechanisms insufficiency. Oxidative stress is implicated in the pathophysiology of many diseases as well as in the aging process; therefore it is necessary to find potent antioxidant substances which could be obtained as food supplements having protective action.

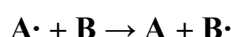
So, in the present dissertation we studied the antioxidant properties of goat whey protein in endothelial cells (cell line EA.hy 926). The antioxidant capacity of cells was assessed by measuring spectrophotometrically the levels of total antioxidant capacity (TAC), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) as well as the levels of protein carbonyls (PC) in cellular suspension. In particular, the levels of oxidative stress markers were assessed in cells treated for 1 hour with 4 different concentrations of whey protein (0.78, 1.56, 3.12 and 6.24 mg/mL) before adding the oxidative agent t-BOOH (tert-Butyl Hydroperoxide) (0.3 mM),. The results showed that the oxidative factor t-BOOH reduced TAC and GSH levels compared to the control samples, whereas in the cells pre-treated with whey protein the levels of the above markers were increased, compared to their levels in cells treated with t-BOOH alone. On the other hand, t-BOOH increased GSSG and PC levels compared to the control samples, whereas in the cells pre-treated with whey protein the levels of the above markers were decreased, compared to their levels in in cells treated with t-BOOH alone.

Therefore, the present results suggest that goat whey protein increases the antioxidant capacity of endothelial cells. However further studies are needed to be performed in order to clarify the molecular mechanism of this antioxidant activity.

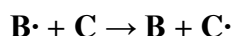
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Ελεύθερες ρίζες καλούνται τα μόρια που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα. Γενικά, μια ρίζα είναι πολύ ασταθής και χημικά δραστική, καθώς το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας έχει την τάση να συζευχθεί με ένα άλλο ηλεκτρόνιο και κάπως έτσι να σταθεροποιηθεί. Μια ρίζα $A\cdot$ αντιδρά με ένα μόριο B , προσλαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο από το τελευταίο, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση της ρίζας $A\cdot$ και τη μετατροπή του μορίου B σε μια νέα ρίζα:



Η δεύτερη ρίζα $B\cdot$ μπορεί να αντιδράσει με ένα τρίτο μόριο C και να παραχθεί μια τρίτη ρίζα $C\cdot$:



Τέλος, εάν η τρίτη ρίζα $C\cdot$ αντιδράσει με το μόριο A προς παραγωγή της αρχικής ρίζας $A\cdot$ τότε ξεκινάει μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών η οποία συνεχίζεται έως ότου λάβει χώρα μια τερματική αντίδραση. Επομένως, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια που δεν είναι ρίζες, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες). Σε περίπτωση που αντιδρούν με μη ρίζες και η τερματική αντίδραση δεν πραγματοποιηθεί, η διαδικασία μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (**Εικόνα 1**). Η τερματική αντίδραση συμβαίνει όταν δυο ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους προς παραγωγή εξουδετερωμένων μορφών:



όπου R συμβολίζει A , B ή C .¹⁻⁴

Πρώτος ο Denham Harman το 1956 πρότεινε την ιδέα για την ύπαρξη της «ελεύθερης ρίζας» και αργότερα έθεσε ως αξίωμα πως αυτά τα συστατικά παίζουν ρόλο στην γήρανση μέσω της πρόκλησης διασταυρωμένων αντιδράσεων και δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών τροποποιώντας πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA και ιδιαίτερα το μιτοχονδριακό DNA. Σήμερα οι ελεύθερες ρίζες ενοχοποιούνται για τη γήρανση, τις καρδιοπάθειες, τον καρκίνο και άλλες χρόνιες ασθένειες. Οι ελεύθερες ρίζες, λοιπόν, είναι προϊόντα του μεταβολισμού, απελευθερώνονται φυσιολογικά στον οργανισμό από τα μιτοχόνδρια, το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, στα οποία και λαμβάνει χώρα η οξείδωση των τροφών (η μετατροπή δηλαδή της τροφής σε ενέργεια).⁵

Λιποειδή	Υπεροξείδωση	Ασθένειες
Πρωτεΐνες	Μετουσίωση	
Ένζυμα	Απενεργοποίηση	
Νουκλεϊκά οξέα	Μεταλλάξεις	Γήρανση

Εικόνα 1: Βλάβες των βιολογικών μορίων λόγω δράσης ελεύθερων ριζών.

1.2 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) ονομάζονται τα δραστικά μόρια που προκύπτουν από το μοριακό οξυγόνο ή εκείνα που εύκολα μετατρέπονται σε δραστικές μορφές και συμμετέχουν σε τοξικές αντιδράσεις για τα κύτταρα. Κυρίως παράγονται στα λευκοκύτταρα και από την μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα. Είναι απαραίτητες για την κυτταρική σηματοδότηση και για την βακτηριακή άμυνα. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες:

- **ελεύθερες ρίζες**, όπως η ρίζα του υδροξυλίου (-OH)
- **ιόντα**, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέως (HClO)

- **συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων**, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)
- **μόρια**, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), η οποία αποτελεί την πιο δραστική μορφή οξυγόνου καθώς παραμένει ελεύθερη για μικροκλάσματα του δευτερολέπτου πριν συνδυαστεί με άλλα μόρια, του υπεροξειδικού ανιόντος ($\text{O}_2^{\cdot-}$), όπως προαναφέρεται, του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}) και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\cdot}), οι θειούχες ρίζες (RS^{\cdot}) και το υποχλωριώδες οξύ (COCl).

Πίνακας 1.2.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου σε Βιολογικά Συστήματα

ROS

Ελεύθερες ρίζες

Ανιόν του υπεροξειδίου
Υδροϋπεροξειδική ρίζα
Ρίζα υδροξυλίου
Ρίζα αλκοξειδίου
Ρίζα υπεροξειδίου

Μη ελεύθερες ρίζες

Υπεροξείδιο του υδρογόνου
Οργανικά υδροπεροξείδια
Μονήρες οξυγόνο
Όζον
Υποχλωριώδες οξύ
Υποβρωμιώδες οξύ

Οι δραστικές μορφές στις οποίες συμμετέχει το άζωτο, ονομάζονται **Δραστικές Μορφές Αζώτου** (Reactive nitrogen species, RNS). Οι τελευταίες, λοιπόν, παράγονται μέσω του φυσιολογικού μεταβολισμού του αζώτου και είναι κυρίως παράγωγα του ενδοθηλιακού μεταβολισμού. Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες οι οποίες έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο, όπως το μονοξείδιο του αζώτου NO^{\cdot} και το διοξείδιο του αζώτου NO_2^{\cdot} καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες, όπως για παράδειγμα το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου $\text{ONOO}^{\cdot-}$.^{1-4,6}

Πίνακας 1.2.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου σε Βιολογικά Συστήματα

<u>RNS</u>
<u>Ελεύθερες ρίζες</u> Ρίζα μονοξειδίου αζώτου Ρίζα διοξειδίου αζώτου <u>Μη ελεύθερες ρίζες</u> Νιτρώδες οξύ Ανιόν νιτροσυλίου Κατιόν νιτροσυλίου

1.2.1. Πηγές Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Οι ROS και γενικότερα οι ελεύθερες ρίζες, μπορούν να δημιουργηθούν ενδογενώς στους οργανισμούς καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του αερόβιου μεταβολισμού του κυττάρου και εξωγενώς ως συστατικά του καπνίσματος, της περιβαλλοντικής ρύπανσης, και έμμεσα μέσω του μεταβολισμού συγκεκριμένων βιομηχανικών διαλυτών, φαρμάκων, παρασιτοκτόνων όπως και μέσω έκθεσης στην ραδιενέργεια – ακτινοβολία.

1.2.1.α Ενδοκυτταρικές πηγές

- **Οξειδωτική φωσφορυλίωση**

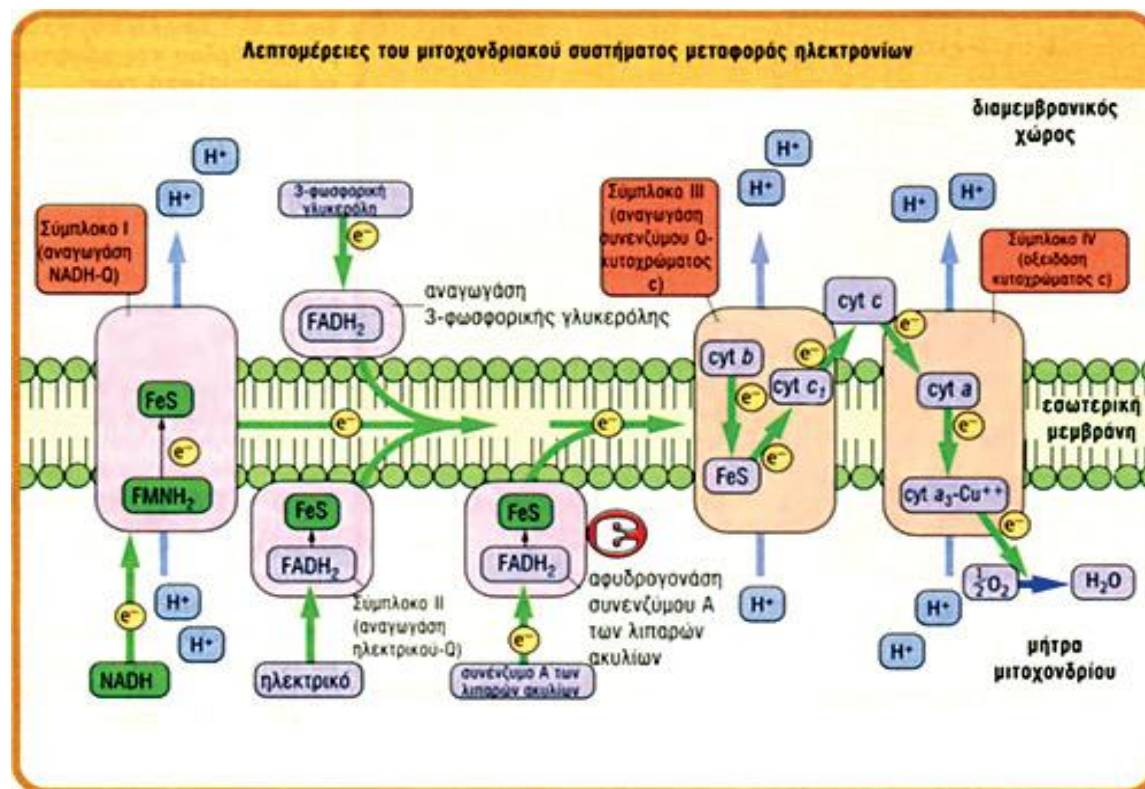
Είναι μια διαδικασία, που πραγματοποιείται από στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και πιθανόν να αποτελεί την πιο σημαντική πηγή ROS στους αερόβιους οργανισμούς. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση, λοιπόν, είναι η διεργασία στην οποία παράγεται ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH₂ προς το O₂, διαμέσου μίας σειράς φορέων ηλεκτρονίων (**Εικόνα 2**).

Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το FADH₂ στο O₂ μέσω μίας αλυσίδας τεσσάρων μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και είναι τα εξής:

- Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (σύμπλοκο I)
- Αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q (σύμπλοκο II)
- Οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III)
- Οξειδάση του κυτοχρώματος (σύμπλοκο IV)

όπου με Q συμβολίζεται η ουβικινόνη.

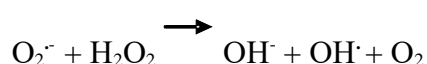
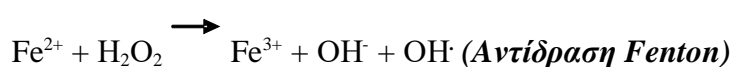
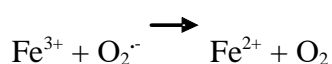
Οι ομάδες που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στα σύμπλοκα αυτά είναι φλαβίνες, σύμπλοκα σιδήρου – θείου, μόρια αίμης και ιόντα χαλκού.⁷⁻¹⁰



Εικόνα 2: Αναπνευστική Αλυσίδα

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλοκο I) και το σύμπλοκο κυτοχρώματος bc₁ (σύμπλοκο III), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής O₂^{•-} και H₂O₂. Το H₂O₂ δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH₂ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει O₂^{•-}. Το O₂^{•-} ανάγεται σε H₂O₂ από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Επιπλέον, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο O₂^{•-} και στο H₂O₂ δημιουργείται OH[•].^{7,11}

Αντίδραση Haber-Weiss:



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την συνθετάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^{\cdot-}$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH^{\cdot} και NO_2^{\cdot} .

Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).^{7,11}

- **Οξειδάση της ξανθίνης**

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών. Καταλύει την οξείδωση τόσο της υποξανθίνης όσο και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με ταυτόχρονη αναγωγή του O_2 σε $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 σε περιπτώσεις όπως τραυματισμού των ιστών ή άλλων, όπου είναι δυνατόν να προκαλείται η μετατροπή της αφυδρογονάσης σε οξειδάση της ξανθίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία $O_2^{\cdot-}$.

Η οξειδάση της ξανθίνης μετατρέπεται από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το Ca^{2+} , ενώ το μοριακό οξυγόνου είναι δέκτης ηλεκτρονίων.¹²⁻¹³

- **Φαγοκύτωση**

Τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα (PMN), τα οποία αποτελούν τον κυριότερο φαγοκυτταρικό πληθυσμό στο ανθρώπινο αίμα, παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια. Τα μακροφάγα και άλλα φαγοκύτταρα έχουν την ικανότητα όταν διεγείρονται να παράγουν μεγάλες ποσότητες $O_2^{\cdot-}$. Η αναγωγή του O_2 προς παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ πραγματοποιείται με έναν πολύπλοκο ενζυμικό μηχανισμό, που εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των φαγοκυττάρων και ονομάζεται NADPH οξειδάση. Διάφοροι παράγοντες, όπως για παράδειγμα ιοί και βακτήρια, διεγείρουν τα φαγοκύτταρα και ενεργοποιούν τον ενζυμικό μηχανισμό. Επαφή των φαγοκυττάρων με αυτούς τους παράγοντες συνεπάγεται μια σειρά αλληλοδιαδοχικών φαινομένων που οδηγούν στην φωσφορυλίωση των κυτοπλασματικών υπομονάδων (p46 και p64), τη μεταφορά τους στη μεμβράνη και την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης. Η εν λόγω ενεργοποίηση έχει σαν αποτέλεσμα την υπερκατανάλωση του O_2 από το φαγοκύτταρο, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό και ως «αναπνευστική έκρηξη». Από

το NADPH προέρχονται τα απαραίτητα ηλεκτρόνια για την αναγωγή του O_2 σε $O_2^{\cdot-}$, το οποίο εν συνεχεία μετατρέπεται σε H_2O_2 . Αυτές οι δύο ενώσεις δεν είναι αρκετά δραστικές για να εξουδετερώσουν τα μικρόβια, για αυτό εκλύεται το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση (MPO), μια αιμοπρωτεΐνη που χρησιμοποιεί το H_2O_2 ως υπόστρωμα για την οξείδωση ιόντων χλωρίου σε υποχλωριώδες οξύ (HOCl).¹⁴⁻¹⁶



- **Ενδοπλασματικό δίκτυο και πυρήνας**

Στα μικροσωμάτια φαίνεται πως η δημιουργία $O_2^{\cdot-}$ προέρχεται από το σύστημα των κυτοχρωμάτων P_{450} και συγκεκριμένα τα ηλεκτρόνια φαίνεται να διαφεύγουν από τις φλαβίνες.¹⁷ Στο ενδοπλασματικό δίκτυο υπάρχουν, επίσης, ένζυμα που εισάγουν διπλούς δεσμούς σε ορισμένες θέσεις στα λιπαρά οξέα. Τα σύμπλοκα αυτά χρειάζονται O_2 , NADPH και ένα ειδικό κυτόχρωμα, το b_5 . Οι φλαβοπρωτεΐνες όπως και το κυτόχρωμα b_5 μπορούν να προκαλέσουν αναγωγή του O_2 με παράπλευρη διοχέτευση ηλεκτρονίων.

Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $O_2^{\cdot-}$, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 .¹⁸ Ο ρυθμός παραγωγής του H_2O_2 είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα.¹⁹ Παρουσία ADP και Fe^{3+} η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O_2 παράγοντας $O_2^{\cdot-}$.

Στην πυρηνική μεμβράνη υπάρχει μια αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της οποίας η φυσιολογική σημασία δεν είναι γνωστή. Τα ηλεκτρόνια και εδώ μπορούν να διαφεύγουν σχηματίζοντας $O_2^{\cdot-}$, το οποίο μπορεί να έχει ειδική σημασία λόγω ακριβώς ότι βρίσκονται πολύ κοντά στο πυρηνικό DNA.

- **Μεταβολισμός των εικοσανοειδών**

Ο μεταβολισμός του αραχιδονικού οξέος συνοδεύεται από τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες αναφέρονται ως ρίζες Ox και έχουν χαρακτηριστικά ριζών υδροξυλίου $\cdot OH$.

- **Αυτοοξειδωση μορίων**

Πολλά μόρια με σημαντικούς βιολογικούς ρόλους όπως οι τετραϋδροπτερίνες, ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη, οι ορμόνες αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη και L-DOPA (διδροξυφαινυλαλανίνη), θειόλες, ανηγμένες φλαβοενώσεις (FMNH₂ και FADH₂) και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν παρουσία O₂ (ουσιαστικά πρόκειται για ανάφλεξη χωρίς φλόγα, έπειτα από αντίδραση με οξυγόνο) σχηματίζοντας ανιόν υπεροξειδίου (O₂⁻). Το σχηματιζόμενο O₂⁻ συμβάλει στην περαιτέρω οξείδωση αυτών των ενώσεων σε μία σειρά πολύπλοκων και εν πολλοίς αγνώστων αντιδράσεων. Οι τελευταίες ευνοούνται παρουσία ιόντων μετάλλων μετάπτωσης, όπως σιδήρου και χαλκού.

- **Αιμοσφαιρίνη**

Περίπου 3% της αιμοσφαιρίνης στον οργανισμό οξειδώνεται καθημερινά από οξυαιμοσφαιρίνη σε μεθ-αιμοσφαιρίνη (Fe³⁺). Ο διαχωρισμός των ηλεκτρονίων μεταξύ του Fe²⁺ και O₂ μπορεί ορισμένες φορές να οδηγήσει σε απελευθέρωση ενός O₂⁻.

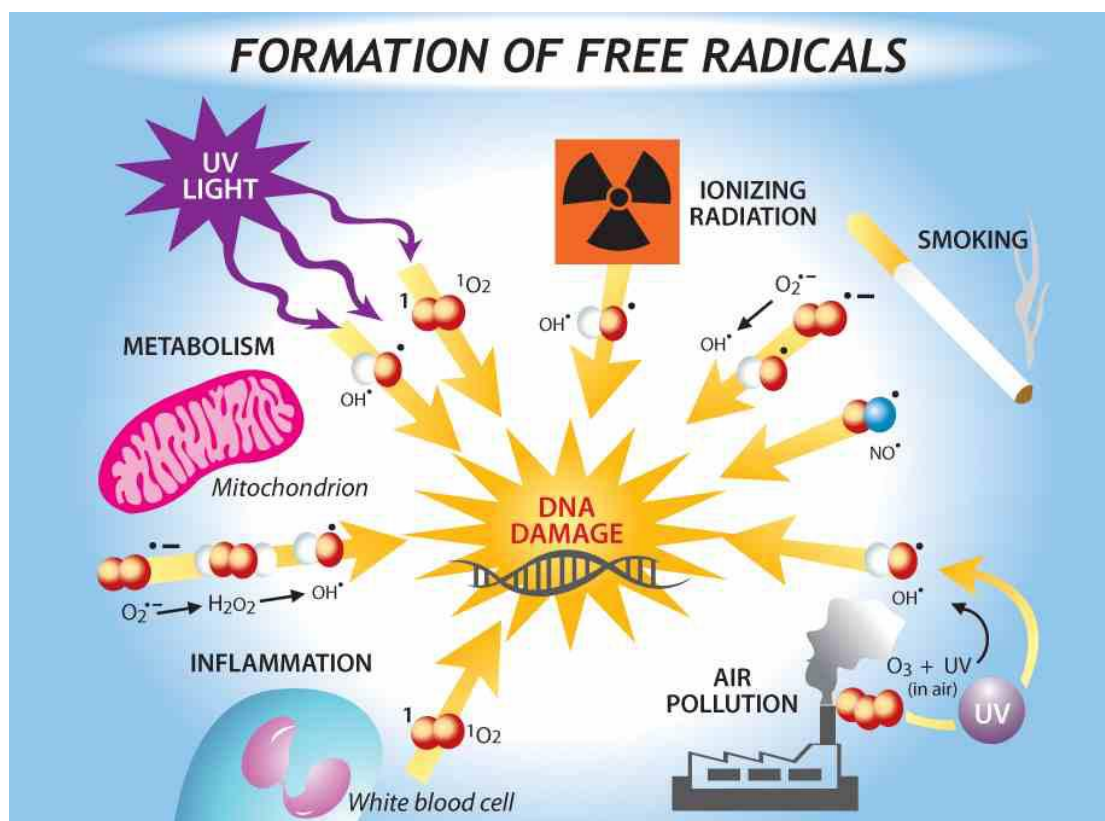
1.2.1.β Εξωκυτταρικές πηγές

Οι υπεριώδεις και ιονίζουσες ακτινοβολίες μπορούν να προκαλέσουν είτε την φωτολυτική διάσπαση ευαίσθητων ενώσεων προκαλώντας τη δημιουργία δύο ελευθέρων ριζών, είτε τη διέγερση άλλων, οι οποίες εν συνεχεία αποσπούν ή αποδίδουν ηλεκτρόνια. Επιπλέον, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες.

Αρκετά φάρμακα προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες λόγω της δημιουργίας των ROS. Ένα από τα καλύτερα μελετημένα φάρμακα αυτού του είδους είναι το αθρακυκλικό αντιβιοτικό δοξορουμπικίνη, γνωστό και με την εμπορική ονομασία ανδριαμυκίνη. Η καρδιοτοξικότητα αυτού του φαρμάκου είναι τόσο έντονη, ώστε είναι ιδιαίτερα δύσκολο να εντοπισθεί η χρυσή τομή μεταξύ των αντικαρκινικών ιδιοτήτων της από την μια πλευρά και των βλαπτικών επιδράσεων στην καρδιά από την άλλη.^{1,4,20-22} Ομοίως, ξενοβιοτικές ουσίες, όπως τοξίνες και

εντομοκτόνα, καθώς και το αλκοόλ μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών.²³

Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή.²⁴



Εικόνα 3: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.3 Βιολογική Δράση Ελευθέρων Ριζών Οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διττό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές.²⁵

1.3.1 Θετικές Δράσεις

Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου παρατηρούνται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικούς ρόλους στην κυτταρική απόκριση στο stress, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική

διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και στην απόπτωση.²⁶⁻²⁸

Όσον αφορά στη φλεγμονή, οι ROS φαίνεται πως σχετίζονται με το σύστημα ανοσίας του οργανισμού, κυρίως δρώντας εναντίον των αντιγόνων κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης, ένας ρόλος που αυξάνεται σημαντικά όταν λαμβάνει χώρα η φλεγμονή προκαλούμενη κυρίως από την έντονη άσκηση ή από τραυματισμούς λόγω έκκεντρης άσκησης.²⁹⁻³⁰

Ακόμη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ενεργοποιώντας διάφορα ένζυμα, στην αποτοξίνωση του οργανισμού, διευκολύνοντας την αναπλήρωση του γλυκογόνου και τέλος στη μυϊκή συστολή όπου όταν αναστέλλεται η παραγωγή των ROS παρατηρείται απώλεια της μυϊκής συστολής, ενώ αντίθετα όταν αυξάνεται η παραγωγή των ROS παρατηρείται η εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.³¹⁻³²

Πίνακας 1.3.1 Σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες που περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή τα παράγωγα τους	
Τύπος ελεύθερης ρίζας	Πηγή
$O_2^{\cdot -}$ και παράγωγα	Οξειδάση NAD(P)H
$O_2^{\cdot -}$ και παράγωγα	Οποιαδήποτε πηγή

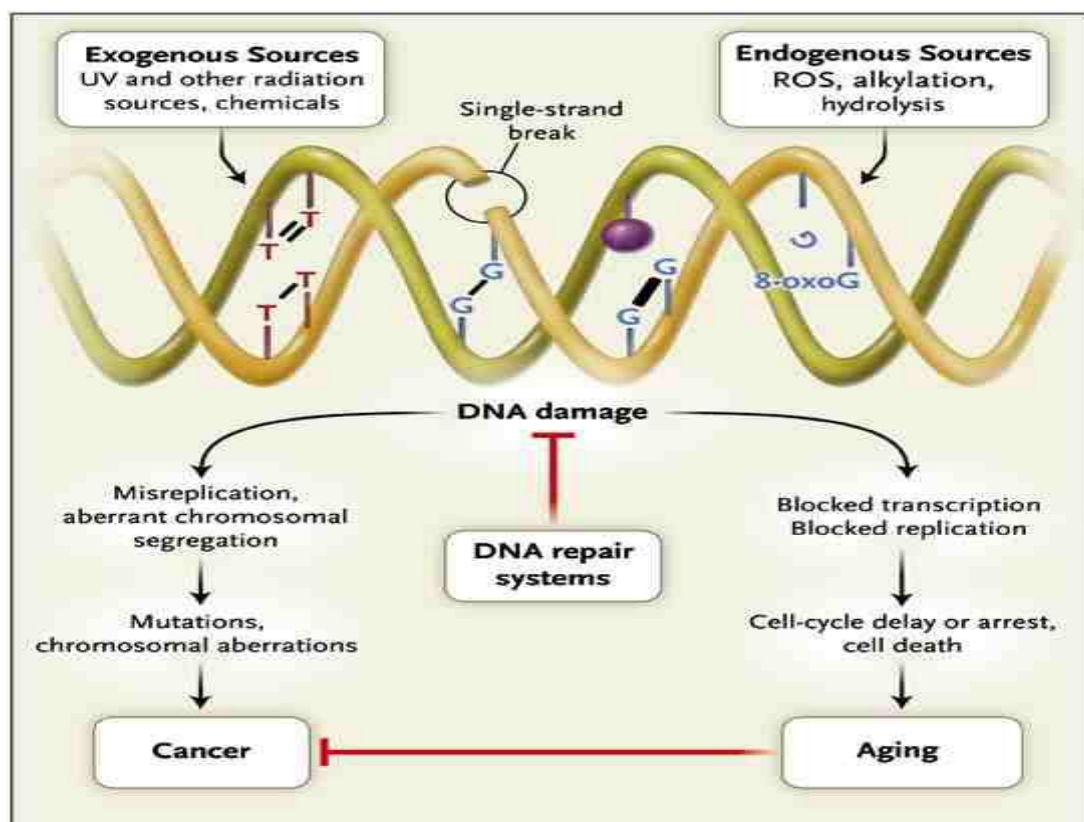
1.3.2. Επιβλαβείς Δράσεις

Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι δυνητικά βλαπτικές για τα συστατικά του κυττάρου. Κατηγορούνται για εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων των μεμβρανών, του DNA, των πρωτεϊνών, καθώς και για υπεροξείδωση των λιποπρωτεϊνών. Επιπλέον, συνδέονται με νευροεκφυλιστικές νόσους, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, του ήπαρ και των πνευμόνων και με φλεγμονές. Η μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού, που προκλήθηκε από οξειδωτική βλάβη, αποτελεί το πρώτο βήμα στην καρκινογένεση, την μεταλλαξιγένεση και την γήρανση.^{22,25}

Επιβλαβείς Επιδράσεις Στο DNA

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου αλληλεπιδρούν με το DNA και μπορούν να προκαλέσουν καταστροφές (**Εικόνα 4**), όπως η τροποποίηση των βάσεων (εκτιμάται ότι οι ROS είναι υπεύθυνες για περίπου 10000 μετατροπές βάσεων DNA ανά κύτταρο

ανά ημέρα), θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, βλάβη στο σάκχαρο δεοξυριβόζης καθώς και στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Παρότι το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA είναι συνεχές, οι τροποποιήσεις που μπορούν να προκληθούν από τις ROS έχουν ως συνέπεια την οξείδωση του DNA που οδηγεί σε μεταλλαξιγένεση, η οποία αποτελεί τον κύριο παράγοντα πρόκλησης καρκίνου στον ανθρώπινο οργανισμό και γήρανσης των κυττάρων.³⁴



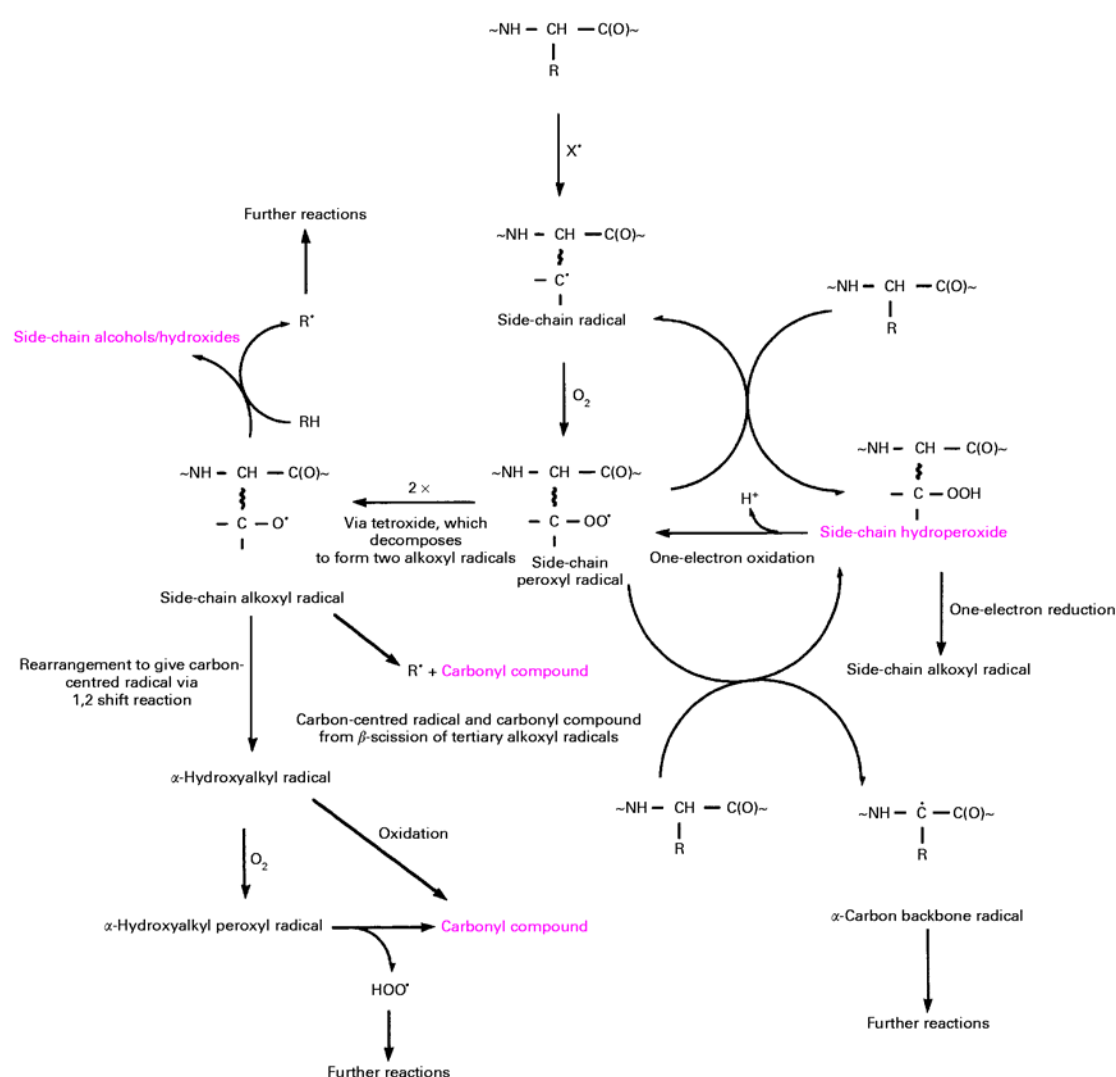
Εικόνα 4: Οι επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στο DNA

Επιβλαβείς Επιδράσεις Στις Πρωτεΐνες

Οι ROS μπορούν να οξειδώσουν τόσο πρωτεΐνες αίματος όσο και δομικές πρωτεΐνες και να αναστείλουν το πρωτεολυτικό σύστημα. Η οξείδωση, λοιπόν, των πρωτεϊνών προκαλεί αντιστρεπτές δισουλφιδικές γέφυρες, αλλάζει την στροφή τους στο χώρο και εν τέλει επηρεάζει τη λειτουργία τους. Το μέγεθος της καταστροφής των πρωτεϊνών εξαρτάται από τη θέση της πρωτεΐνης σε σχέση με τον τόπο παραγωγής των ROS, αλλά και από την σύστασή τους και τη δομή τους. Ορισμένα αμινοξέα, όπως η τρυπτοφάνη, η τυροσίνη, η ιστιδίνη και η κυστεΐνη, είναι πολύ πιο επιρρεπή από άλλα. Γενικά, όμως, οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορούν να αλλάξουν

τόσο τη δευτεροταγή όσο και την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών.³⁵⁻³⁶

Η οξείδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων συνοδεύεται από αυξήσεις στα επίπεδα των ομάδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων (Εικόνα 5).³⁷⁻³⁸ Οι ROS έχουν, επίσης, την ικανότητα να αλλάζουν το λυσοσωμικό σύστημα και το πρωτεάσωμα, δύο κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών.³⁹



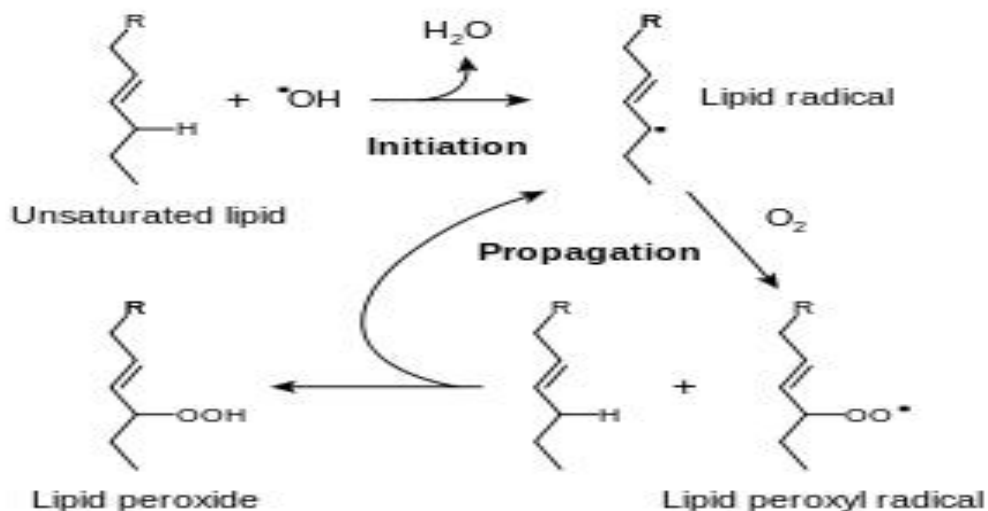
Εικόνα 5: Πορεία πρωτεϊνικής οξείδωσης

Επιβλαβείς Επιδράσεις στα Λιπίδια

Τα μεμβρανικά λιπίδια είναι αρκετά ευάλωτα σε βλάβη προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες. Τα λιπίδια όταν αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, μπορεί να υποστούν μια σειρά αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης (**Εικόνα 6**), οδηγώντας τόσο σε άμεσες όσο και σε έμμεσες επιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η υπεροξειδωση των λιπιδίων συμβαίνει σε τρία στάδια: στο πρώτο στάδιο η ελεύθερη ρίζα αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Το λιπαρό οξύ αντιδρά με το οξυγόνο, όταν το τελευταίο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ρίζας ROO· κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες – επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο.⁴⁵

Ιδιαίτερα ευάλωτα στην επίδραση των δραστικών ριζών οξυγόνου είναι τα υπολείμματα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία στην οξειδωση. Μόλις σχηματιστούν, οι ρίζες υπεροξειδίου μπορούν να μετατραπούν μέσω διεργασίας κυκλοποίησης σε ενδο-υπεροξειδία (πρόδρομες μορφές της μαλονδιαλδεΐδης), ενώ τελικό προϊόν της υπεροξειδωσης αποτελεί η μαλονδιαλδεΐδη (MDA).⁴⁰⁻⁴⁴

Εξίσου σημαντική, λοιπόν, είναι και η καταστροφή των λιπιδίων, καθώς μπορεί να έχει συνέπειες στη λειτουργία και στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) είναι λιγότερο ανθεκτικά στην οξειδωση σε σχέση με τα μονοακόρεστα ή τα κεκορεσμένα λιπαρά οξέα, ώστε η ποικιλία σε PUFA στις μεμβράνες δυνατόν να επηρεάσει και την αναλογία της οξειδωτικής καταστροφής. Παράλληλα, η οξειδωση των λιπών μπορεί να έχει και άλλες συνέπειες, καθώς η υπεροξειδάση των λιπών εμπλέκεται σε πολλές ενδιάμεσες μεταβολικές αντιδράσεις και αυτό έμμεσα ενδεχομένως να βλάψει τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες.⁴⁶⁻⁴⁷



Εικόνα 6: Πορεία λιπιδικής υπεροξειδωσης

Επιβλαβείς Επιδράσεις Στους Υδατάνθρακες

Οι ελεύθερες ρίζες δρουν πάνω στους πολυσακχαρίτες οδηγώντας στον αποπολυμερισμό τους.

1.4 Αντιοξειδωτικοί Κυτταρική Μηχανισμοί

Η συνεχή έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Πιστεύεται πως οι αερόβιοι οργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς άμυνας τόσο αντιοξειδωτικούς όσο και επιδιόρθωσης βλαβών. Η αντιοξειδωτική άμυνα αποτελείται από ενζυμικούς και μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους:

1. Εμποδίζοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών.
2. Μετατρέποντας τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια.
3. Συμμετέχοντας στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

1.4.α Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Περιλαμβάνουν τη **Υπεροξειδική Δισμουτάση** (superoxide dismutase – SOD), την **Καταλάση** (CAT), την **Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης** (glutathione peroxidase – GPx), και την **Αναγωγάση της Γλουταθειόνης** (GR) (Εικόνα 7).

- **Δισμουτάση του Υπεροξειδίου (SOD)**

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου αποτελεί ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυττάρια ενζυμικά συστήματα. Καταλύει τη μετατροπή ανιόντων υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου σύμφωνα με την κάτωθι αντίδραση:



Το εν λόγω ένζυμο απαντά σε αρκετές ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη φύση του μετάλλου του ενεργού κέντρου, τη σύνθεση των αμινοξέων, καθώς και τον αριθμό των υπομονάδων, τους συμπαράγοντες και άλλα χαρακτηριστικά. Στον άνθρωπο απαντούν τρεις μορφές SOD: Cu-SOD στο κυτοσόλιο, Mn-SOD στα μιτοχόνδρια και μια μικρή ποσότητα CuZn-SOD, η οποία βρίσκεται στο εξωκυττάριο υγρό. Στα βακτήρια και τα φυτά βρίσκεται και η Fe-SOD.⁴⁸⁻⁴⁹

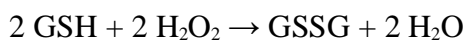
- **Καταλάση (CAT)**

Η καταλάση απαντά στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα αλλά και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, άνω των 500αα, καθεμία από τις οποίες φέρει μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή της, καθώς και ένα μόριο NADPH, που συμβάλει στην σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.⁵⁰

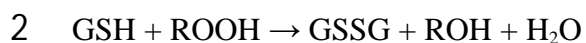


- **Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GPx)**

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα, καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου και είναι άφθονη στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Το αναφερόμενο ένζυμο ανάγει τα υδρουπεροξείδια (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό, ενώ το ίδιο μετατρέπεται σε οξειδωμένη μορφή (GSSG).⁵⁰⁻⁵²



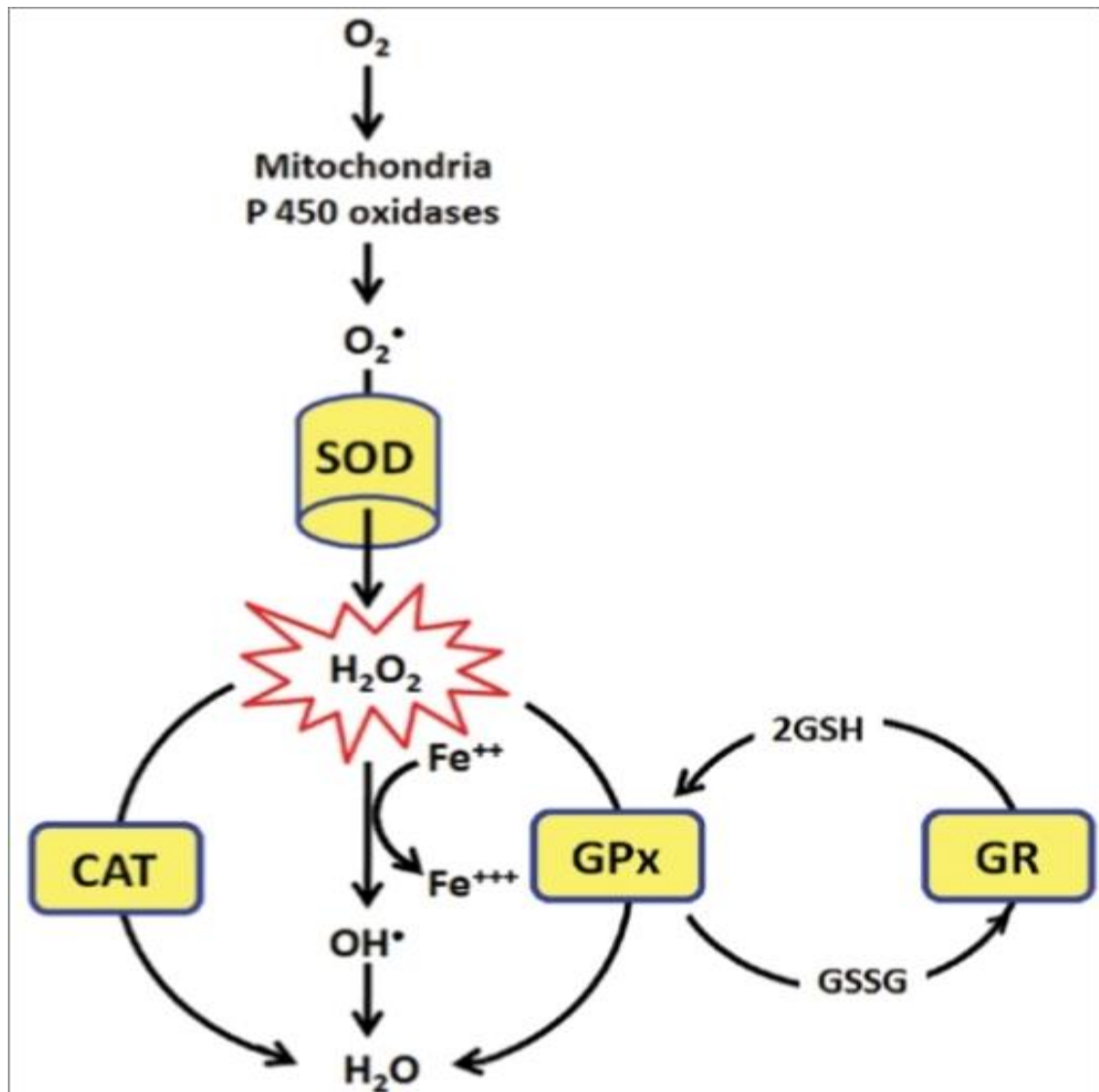
ή



- **Αναγωγή της Γλουταθειόνης (GR)**

Η αναγωγή της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας σε GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, έτσι και η αναγωγή της γλουταθειόνης ανάγει, επιπλέον, τα υδροϋπεροξειδία σε αλκοόλες.

Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.



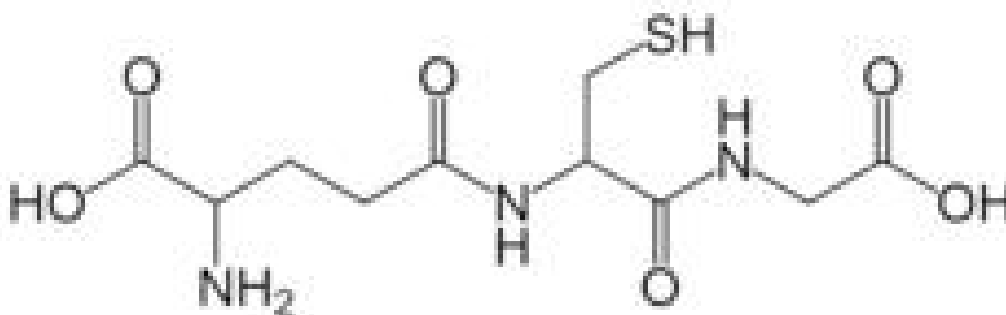
Εικόνα 7: Απεικόνιση της δράσης της Υπεροξειδικής Δισμουτάσης (SOD), της Καταλάσης (CAT), της Αναγωγάσης της Γλουταθειόνης (GR) και της Υπεροξειδάσης της Γλουταθειόνης (GPX).

1.4.β Μη Ενζυμικοί Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την Γλουταθειόνη, τη Βιταμίνη C, την Βιταμίνη E (κυρίως α-τοκοφερόλη), τα Καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή, το Συνένζυμο Q-10, το Σελήνιο και το Ουρικό Οξύ.

- **Γλουταθειόνη**

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) (**Εικόνα 8**) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη και περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG) και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της. Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών και αποτελείται αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού.⁵²⁻⁵³



Εικόνα 8: Συντακτικός τύπος της γλουταθειόνης

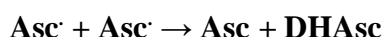
Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου, όπως υπεροξειδάσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες θειόλης, αφυδρογονάση φορμαλδεϋδης, γλυοξαλάση.

Επιπροσθέτως, καθίσταται ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στην μεταφορά των αμινοξέων διά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να επαναφέρει στην ενεργό μορφή τις σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες, βιταμίνη C, βιταμίνη E, άμεσα

ή έμμεσα. Η ικανότητά της αυτή καθορίζεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του ζεύγους GSH/2GSSG.⁵⁴⁻⁵⁶

- **Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)**

Αποτελεί άλλον έναν αναγωγικό παράγοντα ικανό να προστατέψει τα κυτταρικά συστατικά από ισχυρά οξειδωτικά.



Η βιταμίνη C (L- ασκορβικό οξύ) είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και ο κύριος ρόλος της είναι η συμμετοχή στην σύνθεση του κολλαγόνου. Αποτελεί συμπαράγοντα σε αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις, ενώ παράλληλα έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς είναι δότης ηλεκτρονίων με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Σε μεγάλες δόσεις μπορεί να λειτουργήσει σαν προ-οξειδωτικό ανάγοντας μεταβατικά μέταλλα, όπως τα δισθενή ιόντα χαλκού (Cu^{2+}) και τα ιόντα τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}). Η αντιοξειδωτική της δράση είναι ιδιαίτερα έκδηλη στους πνεύμονες και στο φακό του ματιού.⁵⁶⁻⁵⁹

- **Βιταμίνη E**

Η βιταμίνη E (τοκοφερόλες) είναι λιποδιαλυτή και απαντά σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Δρα μεταβάλλοντας την ικανότητα οξείδωσης των ROS και απενεργοποιώντας το μονήρες οξυγόνο μέσω της μετατροπής σε ρίζα τοκοφερόλης. Πιο συγκεκριμένα, η δομή της και κυρίως ο φαινολικός δακτύλιος επιτρέπει την προσφορά ιόντων υδρογόνου στις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τον τερματισμό τους. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Πιο συγκεκριμένα, η α-τοκοφερόλη προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση και αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.⁶⁰⁻⁶²

- **Καροτενοειδή**

Πρόκειται για χρωστικές, που απαντούν στο φυτικό βασίλειο και σε μικροοργανισμούς, αλλά δεν συντίθενται από ζώα. Ευθύνονται για το κόκκινο, το κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση απαντούν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθοφίλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο.⁶³

Είναι πλέον ευρέως γνωστό και επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι ο ρόλος των καροτενοειδών δεν περιορίζεται απλά στην απόδοση συγκεκριμένου χρώματος στις τροφές που περιέχονται, αλλά αποτελούν βασικά αντιοξειδωτικά. Το β-καροτένιο είναι το βασικότερο καροτενοειδές και είναι η πιο δραστική πρόδρομος ουσία της βιταμίνης Α. Το β-καροτένιο, λοιπόν, πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C και E καθώς και με το σελήνιο. Επιπλέον, παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης.^{48,64}

- **Συνένζυμο Q 10**

Το συνένζυμο Q10 ή αλλιώς ουβικινόνη παίρνει μέρος στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου παράγεται ATP. Αποτελεί πηγή O₂⁻ όταν είναι μερικώς αναχθέν υπό τη μορφή της ημικινόνης, ενώ όταν έχει αναχθεί πλήρως παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας τα λιπίδια και της πρωτεΐνες από υπεροξείδωση καθώς και το μιτοχονδριακό DNA. Παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης.

- **Φλαβονοειδή**

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που παράγονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό. Έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες και είναι ικανά να αντιδρούν με μεγάλο αριθμό δραστικών μορφών οξυγόνου, αζώτου και χλωρίου. Ακόμη, είναι ικανά να περιορίζουν την προ-οξειδωτική δραστηριότητα των μεταλλικών ιόντων.⁶

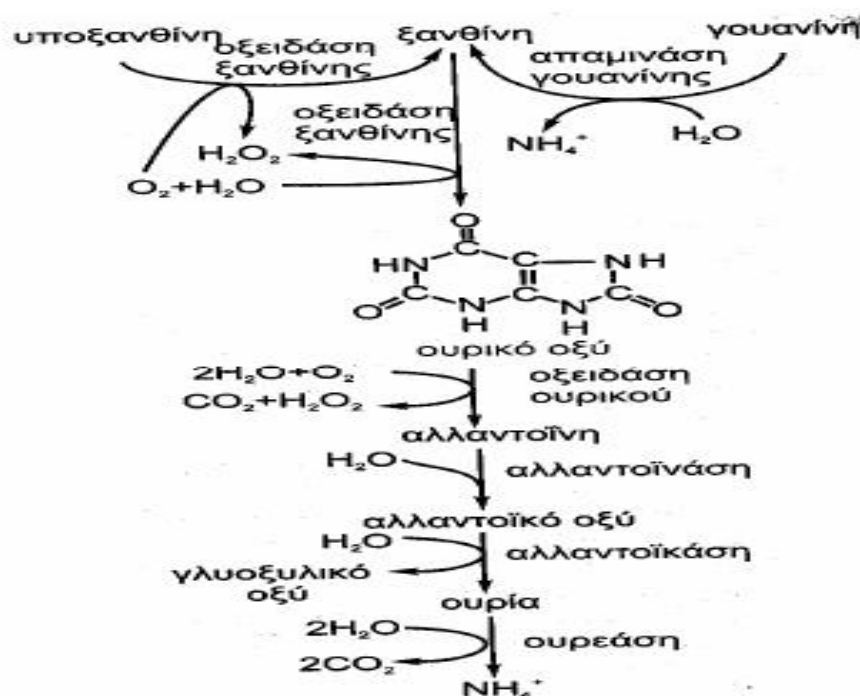
- **Σελήνιο**

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, που συμμετέχει στη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη ασθενειών στον άνθρωπο. Παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες ως συμπαραγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.

- **Ουρικό οξύ**

Το ουρικό οξύ δημιουργείται κατά τον μεταβολισμό των πουρινών με την οξείδωση της ξανθίνης ή της υποξανθίνης (**Εικόνα 9**). Διάφοροι οξειδωτικοί παράγοντες όπως ROO, OH, ¹O₂ και άλλοι, οξειδώνουν το ουρικό οξύ σε ρίζα του

ουρικού που με την σειρά της μπορεί να αναχθεί πάλι σε ουρικό από το ασκορβικό οξύ. Για την εν λόγω ιδιότητα το ουρικό οξύ αποτελεί έναν σημαντικό φυσιολογικό αντιοξειδωτικό παράγοντα *in vivo*. Λειτουργεί δεσμεύοντας τον σίδηρο και/ή τον χαλκό με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πραγματοποίησης των οξειδωτικών αντιδράσεων που εξαρτώνται από την παρουσία μετάλλων.⁶⁶⁻⁶⁷



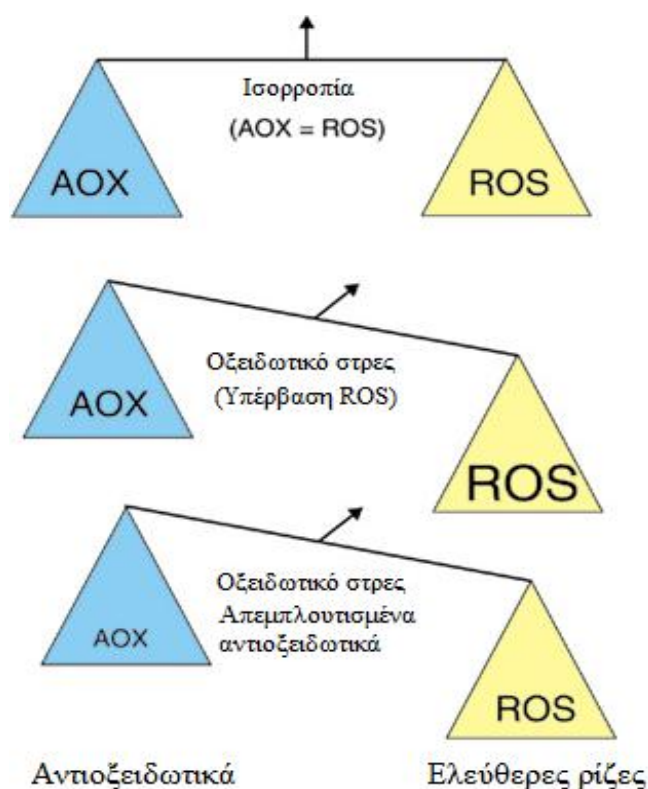
Εικόνες 9: Παραγωγή ουρικού οξέος

1.5 Οξειδωτικό Στρες

Τι είναι το Οξειδωτικό Στρες

Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα παράγουν συνεχώς ελεύθερες ρίζες ως μέρος διαφόρων μεταβολικών διαδικασιών, αυτές εξουδετερώνονται μέσω αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος που διαθέτει ο κάθε οργανισμός συμπεριλαμβάνοντας διάφορα ένζυμα όπως καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, αλλά και βιολογικά αντιοξειδωτικά όπως γλουταθειόνη, βιταμίνη A, C, E, ουβικινόνη, φλαβοειδή κ.α. Ως οξειδωτικό στρες

ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Οξειδωτικό Στρες

Οι αιτίες που το προκαλούν

Υπάρχουν δυο κατηγορίες παραγόντων που αυξάνουν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών και προκαλούν οξειδωτικό στρες, οι εξωγενείς και οι ενδογενείς παράγοντες (Εικόνα 11).

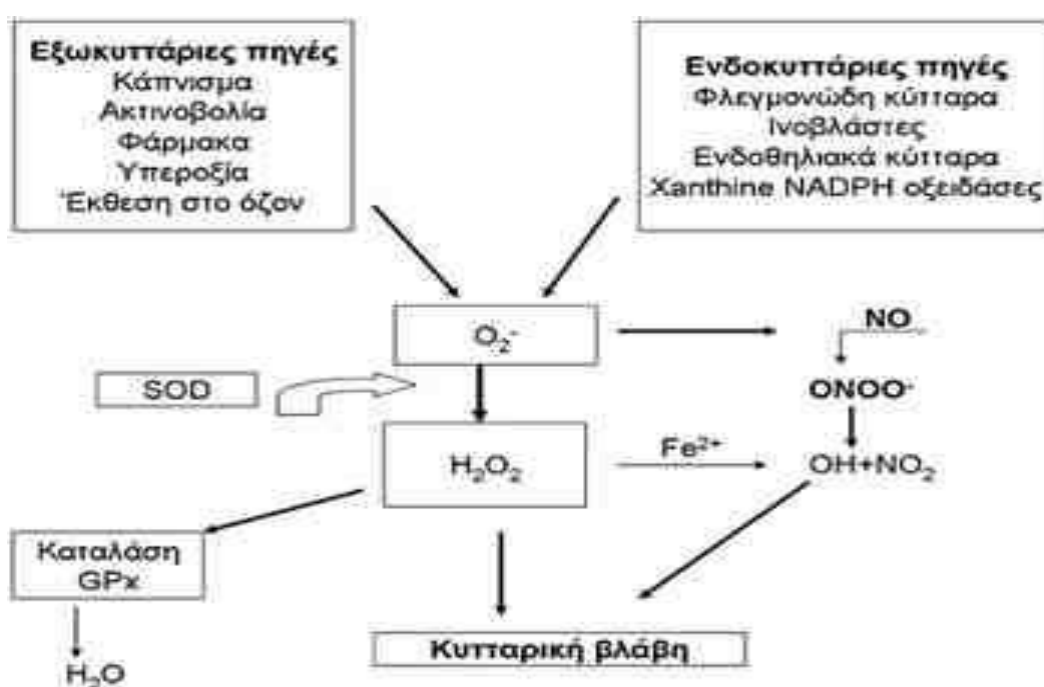
1) Ενδογενείς πηγές:

- Μιτοχόνδρια
- Κυτταρόπλασμα
- Ενδοπλασματικό δίκτυο

- Βιολογικές μεμβράνες

2)Εξωγενείς πηγές:

- Περιβαλλοντική ρύπανση (μόλυνση νερού, αέρα, τροφής)
- Ηλιακή (υπεριώδης) ακτινοβολία και διαφόρων τύπων ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία
- Βαριά σωματική άσκηση
- Κάπνισμα, αλκοόλ, κακή διατροφή
- Φάρμακα και τοξικές ουσίες



Εικόνα 11: Εξωκυττάριας και Ενδοκυττάριας πηγές οξειδωτικού στρες

Αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στους οργανισμούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν μια σειρά από βιοχημικούς δείκτες. Για παράδειγμα, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσής των λιπιδίων είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, ενώ για την καταστροφή των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Για την αξιολόγηση της

οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος. Εκτός από το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα οι παραπάνω δείκτες μπορούν να προσδιοριστούν σε αιώρημα κυττάρων που έχουν διαρρηχθεί με υπέρηχους.⁵³

1.5.1 Οι επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί σοβαρές κυτταρικές βλάβες και γι' αυτό θεωρείται η κύρια αιτία που οδηγεί στη γήρανση και στην ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών, όπως καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων.

Το οξειδωτικό στρες δεν αποτελεί ασθένεια, αλλά μια αρνητική κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει ή να επιταχύνει μια ασθένεια. Ο κατάλογος των ασθενειών για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες αυξάνεται συνεχώς.² Στον κάτωθι πίνακα δίνονται οι ασθένειες που είναι άμεσα συνδεδεμένες με τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Πίνακας 1.5 Ασθένειες που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες	
Καρκίνος	Νόσος Parkinson
Αρτηριακή πίεση	Ρευματικά Νοσήματα
Αρτηριοσκλήρωση	Διαβήτης
Έμφραγμα του μυοκαρδίου	Ηπατοπάθειες
Νόσος Alzheimer	Ελκώδης Κολίτιδα

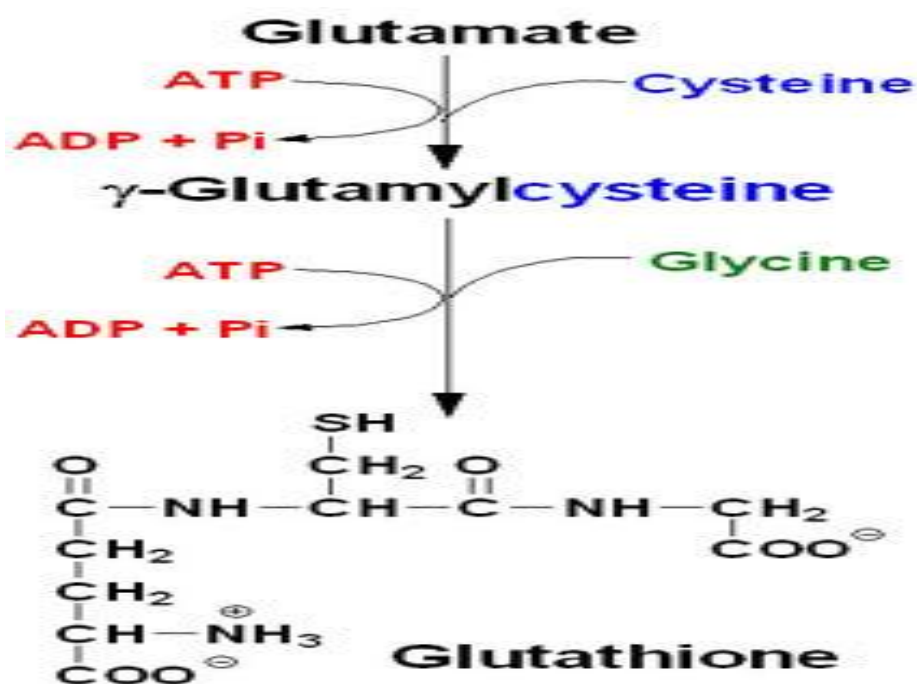
1.6 Η Πρωτεΐνη Ορού Γάλακτος (Cheese – Whey Protein)

Ο ορός γάλακτος ή διαφορετικά τυρόγαλο είναι ένα παραπροϊόν της βιομηχανίας τυριού και τυροπήγματος, που για σειρά ετών θεωρείτο ως απόβλητο και πρόβλημα για το περιβάλλον. Στην πραγματικότητα, όμως, πρόκειται για μία πολύ χρήσιμη πρώτη ύλη για παραγωγή σειράς προϊόντων διατροφής. Το τυρόγαλο αποτελείται από τη β-λακτοσφαιρίνη, την α-λακταλβουμίνη, την αλβουμίνη ορού βοοειδών, τη λακτοφερρίνη, τις ανοσοσφαιρίνες, τα ένζυμα λακτοϋπεροξειδάσης, τα

γλυκομακροπεπτίδια και τη λακτόζη. Αυτά τα συστατικά το καθιστούν ως ένα πολύ χρήσιμο διατροφικό στοιχείο έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία. Επιπλέον, έχει υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, όπως λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη, τα οποία αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην υπερτροφία των μυών, στην αύξηση της δύναμης, καθώς και στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση των ιστών. Η λευκίνη έχει αναγνωριστεί ως το αμινοξύ-κλειδί κατά τη διαδικασία έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης.⁶⁸

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος καλύπτει πλήρως τις ανάγκες του ανθρώπινου οργανισμού σε όλα τα βασικά αμινοξέα, όλες τις βιταμίνες και τα περισσότερα μέταλλα. Έχει ένα πλήθος ευεργετικών επιδράσεων, όπως οστική ανάπτυξη, υπογλυκαιμική επίδραση, αντιφλεγμονώδης προστασία και αντιοξειδωτική ενίσχυση, βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος και προστασία από λοιμώξεις. Επίσης, χρησιμοποιείται από πολλούς αθλητές για αύξηση μυϊκού όγκου και γράμμωση. Και τέλος, νέες μελέτες προτείνουν την πρωτεΐνη ορού γάλακτος ως έναν ισχυρό αναστολέα του καρκίνου, και επομένως μπορεί να βοηθά στην πρόληψη του τελευταίου.

Ο πρωταρχικός μηχανισμός με τον οποίο ο ορός γάλακτος πιστεύεται ότι ασκεί τη δράση του είναι με την ενδοκυτταρική μετατροπή του αμινοξέος κυστεΐνη σε γλουταθειόνη, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Γενικά, η γλουταθειόνη αποτελείται από γλυκίνη, γλουταμινικό οξύ και κυστεΐνη (**Εικόνα 12**). Η εν λόγω πρωτεΐνη παρέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για την παραγωγή της γλουταθειόνης, συμπεριλαμβανομένης της κυστεΐνης, της γλυκίνης και της γλουταμινικού οξέος, ενώ παρέχει μια μορφή κυστεΐνης, την γ-γλουταμυλκυστεΐνη, η οποία είναι υψηλά βιοενεργή στο να μετατρέπεται σε γλουταθειόνη. Η κυστεΐνη περιέχει μια ομάδαθειόλης που χρησιμοποιείται ως δραστικός αναγωγικός παράγοντας στην πρόληψη της οξείδωσης και της βλάβης των ιστών.⁶⁸⁻⁶⁹



Εικόνα 12: Σύνθεση της γλουταθειόνης

Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς περιέχει σε μεγάλες ποσότητες λακτοφερίνη, η οποία είναι μια πρωτεΐνη ενισχυτική του ανοσοποιητικού συστήματος. Η λακτοφερίνη αναχαιτίζει όγκους του εντέρου και ενδεχομένως όγκους σε άλλα σημεία. Δρα προκαλώντας απόπτωση, αναχαιτίζει αγγειογένεσης, ρύθμιση ενζύμων που μεταβολίζουν καρκινογόνα και ως εκκαθαριστής σιδήρου (πριν οξειδωθεί ο σίδηρος). Τα καρκινικά κύτταρα, προκειμένου να αναπτύσσονται γρήγορα μη φυσιολογικά, χρειάζονται περισσότερο σίδηρο από ό, τι τα φυσιολογικά κύτταρα. Έτσι η λακτοφερίνη, δεσμεύοντας τον σίδηρο, μειώνει τις πιθανότητες σχηματισμού ελευθέρων ριζών, προλαμβάνει την καταστροφή των κυττάρων και σταματά την ανάπτυξη του καρκίνου. Επιπλέον, σκοτώνει τα μικρόβια, θρέφει τα φιλικά βακτήρια, ενισχύει την γονιδιακή μεταγραφή, μειώνει τη φλεγμονή, καταπολέμα την παχυσαρκία και ενισχύει την ανοσία.⁷⁰

1.6.1 Παρασκευή Πρωτεΐνης Ορού Γάλακτος

Το πλήρες γάλα βοοειδών έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, το 20% των οποίων είναι πρωτεΐνες του ορού. Όταν αφαιρεθούν οι καζεΐνες από το πλήρες

γάλα, παραμένει η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή, έχοντας μία συγκέντρωση περίπου 65%.

Το γάλα παστεριώνεται σε υψηλή θερμοκρασία για μικρή χρονική περίοδο (72 °C, 30s) και διατηρείται όλη τη νύχτα στους 40 °C. Έπειτα το μίγμα ψύχεται στους 30 °C, εμβολιάζεται με καλλιέργεια βακτηρίων με σκοπό την παραγωγή γαλακτικού οξέος ώστε να πέσει το pH και επωάζεται για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται το εκχύλισμα πυτιάς και το μίγμα αναδεύεται έως ότου πήξει.

Η πυτιά προέρχεται από τον τέταρτο στόμαχο των νεογέννητων μοσχарιών. Η χυμοσίνη, που αποτελεί το ενεργό ένζυμο της πυτιάς, βοηθά στο πήξιμο του γάλακτος διαχωρίζοντας το σε πηγμένο γάλα για τυρί και σε ορό γάλακτος. Στα νεογέννητα μοσχάρια, η χυμοσίνη βοηθά στη χώνεψη και στην απορρόφηση του γάλακτος, ωστόσο, οι ενήλικες αγελάδες δεν έχουν αυτό το ένζυμο.

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή στραγγίζεται διαμέσου κοσκίνων από ανοξείδωτο ατσάλι και το πηγμένο γάλα για τυρί που παραμένει κόβεται και θερμαίνεται στους 30 °C. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε υγρή μορφή έπειτα φιλτράρεται στους 45 °C και προστίθεται κιτρικό οξύ έτσι ώστε να ρυθμιστεί το pH στο 3. Το υγρό φιλτράρεται έπειτα στο 1/5 του συνολικού του όγκου με αποτέλεσμα να παράγεται το συμπύκνωμα του ορού γάλακτος το οποίο περιέχει περίπου 80% πρωτεΐνη. Το συμπύκνωμα μπορεί έπειτα να μικροδιηθηθεί και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να φτάσει το 95%.

Το τελικό συμπύκνωμα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος θερμαίνεται και ξηραίνεται με ψεκασμό έτσι ώστε να προκύψει η σκόνη της πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Με τη διαδικασία ανταλλαγής ιόντων μπορεί να αφαιρεθεί η λακτόζη και τα λίπη από το συμπύκνωμα. Πολλοί παραγωγοί υδρολύουν (μέσω θέρμανσης ή χρήσης περιοριστικών ενζύμων) την πρωτεΐνη ορού γάλακτος με σκοπό να παρέχουν περισσότερα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα στο τελικό προϊόν αυξάνοντας έτσι τη θρεπτική αξία της πρωτεΐνης καθώς διευκολύνεται η απορρόφηση.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη μελέτη της επίδρασης της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπου (κυτταρική σειρά EA.hy926). Χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικές μεθόδους προσδιορίσαμε δείκτες οξειδωτικού στρες (ανηγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και πρωτεϊνικά καρβονύλια) για να εξετάσουμε εάν η πρωτεΐνη παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση και αν ναι, σε ποια τιμή συγκεντρώσεως της.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Gibco, Sigma-Aldrich και Becton-Dickinson.

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων EAhy926 έχει ως πρώτες ύλες τα εξής:

- ❖ Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/L Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco BRL 41966)
- ❖ 2mM L-γλουταμίνη (Biochrom KG Seromed)
- ❖ Πενικιλίνη/Σρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gibco)
- ❖ Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed)

Για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο με 10% FBS, ενώ στο στάδιο της προσθήκης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS.

α) Θρεπτικό μέσο με 10% FBS

- ❖ 250mL DMEM41966
- ❖ 25mL FBS
- ❖ 2,5mL pen/str
- ❖ 2,5mL Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS

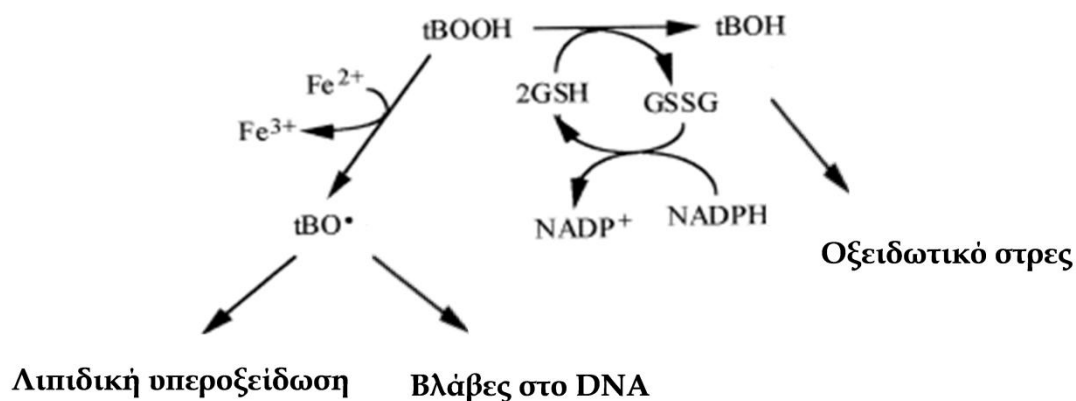
- ❖ 250mL DMEM41966
- ❖ 2,5mL pen/str
- ❖ 2,5mL Γλουταμίνη

Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια, για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, παρουσιάζονται κάτωθι:

- ❖ Phosphate buffer 10 mM (pH 7,4)
- ❖ DPPH 0,1 mM, MB: 394,32
- ❖ Phosphate buffer 67mM (pH 8)
- ❖ DTNB (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό
- ❖ Τρυψίνη 0,25% (Gibco)
- ❖ PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)
- ❖ Phosphate buffer (pH 7,5)
- ❖ Standard GSSG 10 $\mu\text{mol/L}$ (MB: 612,6)
- ❖ NADPH 3mM
- ❖ DTNB 10 mM
- ❖ Διάλυμα HCl 2,5N
- ❖ DNPH 14mM
- ❖ Ουρία 5M

3.1.2 Τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (t-BOOH)

Ο οξειδωτικός παράγοντας τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο είναι ένα οργανικό υδροπεροξειδίο. Χρησιμοποιείται συνήθως ως τοξικός παράγοντας σε ηπατικά κύτταρα για τη μελέτη των μηχανισμών της δράσης ελευθέρων ριζών στα ηπατοκύτταρα. Ο κύριος μηχανισμός δράσης του t-BOOH που έχει προταθεί παρουσιάζεται στην **Εικόνα 13**. Έχει παρατηρηθεί ότι το t-BOOH οξειδώνει την GSH, μέσω της δράσης της GPx και οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG. Επιπλέον, αλληλεπιδρά με ιόντα Fe^{2+} οδηγώντας στον σχηματισμό των ριζών tBO \cdot . Τόσο οι παραγόμενες ρίζες tBO \cdot όσο και η αλληλεπίδραση του t-BOOH με την GSH, έχουν συνδεθεί με την λιπιδική υπεροξείδωση και την πρόκληση βλαβών στο DNA.



Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

3.1.3 Κυτταρική σειρά EA.hy926

Για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τύπου EA.hy926 (αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου), που αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549). Η αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά που προέκυψε διαθέτει πολλές αγγειακές, ενδοθηλιακές ιδιότητες και επίσης η κυτταρική αυτή σειρά μπορεί να αναπτύσσεται ταχύτατα χωρίς την

προσθήκη κάποιου ειδικού παράγοντα ανάπτυξης. Ακόμη, διαθέτει ένα μοναδικό δείκτη χρωμοσωμάτων που βοηθά στην εύκολη ταυτοποίηση τους. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν αυτή την κυτταρική σειρά ως πρότυπο για τη μελέτη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου.⁷⁵



Εικόνα 14: Κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy 926

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 75 cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (10mL), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/mL)/στρεπτομυκίνης (100μg/mL)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37 °C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα, έπειτα πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 1mL τρυψίνης 0,25%. Πιο συγκεκριμένα κατά το split αφαιρείται το θρεπτικό υλικό που υπάρχει ήδη μέσα στην φλάσκα, ύστερα τοποθετούνται 2mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS το οποίο ξεπλένει το θρεπτικό υλικό, ώστε να μην επηρεαστεί η διαδικασία, στη συνέχεια προστίθεται 1mL τρυψίνης 0,25% και ακολουθεί επώαση

για 5 min στους 37 °C στον κλίβανο επώασης και επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

3.2.2 Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού των δεικτών του οξειδωτικού στρες μετά την χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος (Whey protein) και του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH.

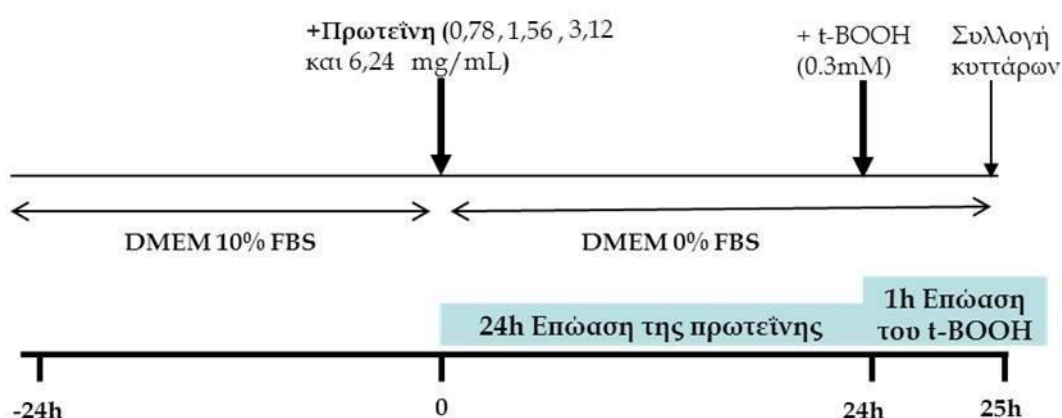
Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην (Εικόνα 15). Τα κύτταρα επωάζονται σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων επιφάνειας 75 cm² παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM (10 mL), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS για 24 ώρες. Τη δεύτερη μέρα γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα τοποθετείται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (10 mL), ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και η πρωτεΐνη Whey (1 mL) στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL).

Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης για 24h. Την τρίτη ημέρα πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό μέσο DMEM απουσία ορού FBS και οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH (0,3 mM) για 1h, χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο δίχως ορό FBS προκειμένου να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του ορού FBS με την πρωτεΐνη και τον t-BOOH και επηρεαστούν τα αποτελέσματα. Στις φλάσκες που αποτελούσαν τον μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό απουσία ορού FBS.

Με το πέρας της επώασης των κυττάρων παρουσία πρωτεΐνης, ακολουθεί η αφαίρεση του θρεπτικού, πλύση των κυττάρων με 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4), ώστε να αφαιρεθεί εντελώς το θρεπτικό υλικό, αποκόλληση των κυττάρων με 1mL τρυψίνη 0,25%, επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (mL) και τοποθέτηση τους σε falcon των 10 mL.

Η δράση κάθε συγκέντρωσης πρωτεΐνης εξετάστηκε εις τριπλούν σε ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες.

Εν συνεχεία, τα κύτταρα που βρίσκονται στα falcon φυγοκεντρώνονται στα 3000g, στους 4 °C για 5 min. Αφαιρείται το υπερκείμενο, ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 1 mL PBS και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, αφαιρείται το υπερκείμενο και κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL PBS. Έπειτα διαρρηγνύουμε τα κύτταρα με υπερήχους για 1 min σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec, ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 1500g για 15 min στους 4 °C και συλλογή του υπερκείμενου, που αποτελεί το κυτταρικό αιώρημα. Το υπερκείμενο διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση. Τέλος, ακολούθησε ο προσδιορισμός της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων φασματοφωτομετρικά, αφού προηγήθηκε ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.



Εικόνα 15: Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης της πρωτεΐνης τυρογάλακτος στα επίπεδα της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης, της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επωάζονται για 24h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος και του t-BOOH. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

3.2.3 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά

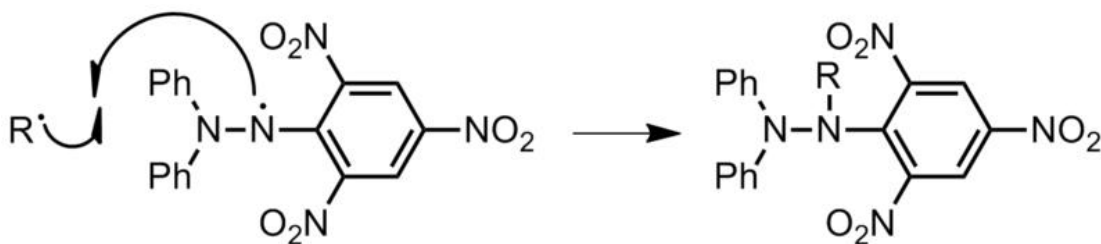
3.2.3.α Αρχή της μεθόδου

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο δύσκολος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη), που έχει κίτρινο χρώμα. Το DPPH φέρει μπλε χρώμα, δίνει απορρόφηση στα 517 nm και είναι φωτοευαίσθητο. Στην περίπτωση που το DPPH αναμιχθεί με μια αντιοξειδωτική ουσία, έχουμε την εξής αντίδραση αναγωγής (**Εικόνα 16**):



Εικόνα 16: Αντίδραση αναγωγής της ρίζας DPPH με αντιοξειδωτικό

3.2.3.β Πειραματικό πρωτόκολλο

Ο προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) έγινε με βάση την μέθοδο των Janaszewska και Bartosz.⁷⁶

Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στον οποίο περιέχονται 50 μ L κυτταροπλασματικού αιωρήματος, 450 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4, 10 mM) και 500 μ L διαλύματος ρίζας DPPH* 0,1 mM (50 μ M τελική συγκέντρωση ρίζας). Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 20000 g στους 25 °C για 3 min και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα. Τα δείγματα που περιέχουν μόνο τη ρίζα στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) αποτελούν το μάρτυρα. Ως θετικός μάρτυρας αντιοξειδωτικής δράσης αποτελούν τα δείγματα που περιέχουν 5 μ L ασκορβικού οξέος 10 mM, 495 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) και 500 μ L διαλύματος 0,1 mM ρίζας DPPH*. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

3.2.3.γ Υπολογισμοί

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως τα μ mol της ρίζας DPPH* που ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) από τα αντιοξειδωτικά συστατικά του κυτταροπλασματικού αιωρήματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TAC (}\mu\text{mol DPPH}^{\cdot} / \text{mg πρωτεΐνης)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 0,05 \times 20 / C_s$$

A_0 : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα.

A_s : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (κυτταροπλασματικό αιώρημα).

Τιμή 0,05: η συγκέντρωση $\mu\text{mol/mL}$ της ρίζας DPPH στην αντίδραση.

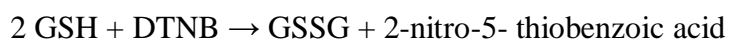
Τιμή 20: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τέλ. αντίδρασης}} / \mu\text{L αιωρήματος}$ [$1000 \mu\text{L} / 20 \mu\text{L}$]).

C_s : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

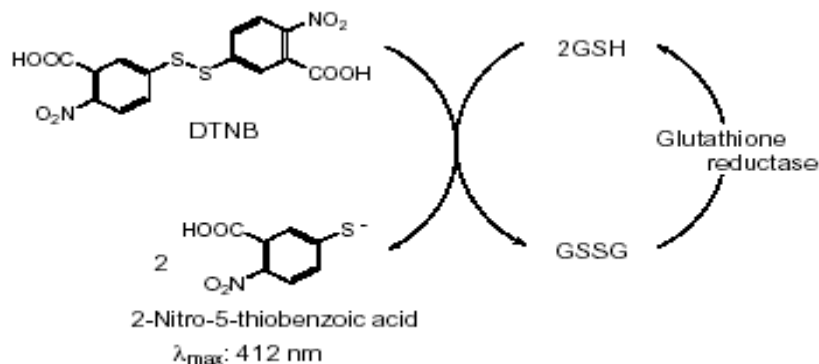
3.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά

3.2.4.a Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε κυτταρικό αιώρημα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm.



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (**Εικόνα 17**).



Εικόνα 17: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

3.2.4.β Πειραματικό πρωτόκολλο

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH έγινε με βάση την μέθοδο των Reddy et al.⁷⁷

Πιο αναλυτικά για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της GSH, 150 μL ερυθροκυτταρικού κυτταρολύματος προστίθενται σε 520 μL 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 8) και 330 μL διαλύματος DTNB 1 mM. Τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min, η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH, στην συνέχεια ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm. Τα δείγματα χωρίς το ερυθροκυτταρικό κυτταρολύμα και με 150 μL PBS αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

3.2.4.γ Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmol GSH / mg πρωτεΐνης} = [(A_{\delta} - A_0) / 13,6 \times 6,6 \times 1000] / C_{\delta}$$

A_{δ} : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0 : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

ϵ_{GSH} ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της GSH

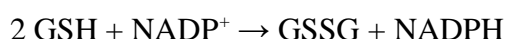
Τιμή 6,6: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ. αντίδρασης}} / \mu\text{L αιωρήματος}$ [1000 μL / 150 μL]).

C_8 : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

3.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά

3.2.5.α Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της GSSG γίνεται έμμεσα και βασίζεται στην αναγωγή της GSSG σε GSH μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR). Η GSH οξειδώνεται από το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που έχει οπτική απορρόφηση στα 412nm. Στην αντίδραση προστίθεται το διάλυμα της 2-βινυλ-πυριδίνης το οποίο εμποδίζει την οξείδωση της GSH σε GSSG χωρίς να παρεμποδίζει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSSG. Για την μετατροπή της GSSG του δείγματος σε GSH και την δημιουργία του χρώματος προστίθεται το NADPH.



3.2.5.β Πειραματικό πρωτόκολλο

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSSG βασίζεται στην μέθοδο των Reddy et al.⁷⁷

Πιο αναλυτικά, αρχικά σε 50 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος (pH 7,4) προστίθενται 5 μL αραιωμένου 1/100 διαλύματος 2-βινυλ-πυριδίνης. Τα δείγματα επωάζονται για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1 mL στο οποίο περιέχονται 600 μL 143 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου (6,3 mM EDTA, pH 7,5), 100 μL διαλύματος NADPH 3 mM, 100 μL διαλύματος DTNB 10 mM, 189 μL PBS και 10 μL κυτταροπλασματικού αιωρήματος που έχει επωαστεί με τη 2-βινυλ-πυριδίνη. Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια προστίθενται 1 μL ενζύμου GR.

Αμέσως μετά την προσθήκη τους ενζύμου ακολουθεί μέτρηση της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης στα 412 nm για 3 min. Τα δείγματα χωρίς το κυτταροπλασματικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό (199 μ L PBS) και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Ο προσδιορισμός της οξειδωμένης γλουταθειόνης στα δείγματα υπολογίζεται μέσω πρότυπου δειγμάτων που περιέχουν 75 μ L διαλύματος οξειδωμένης γλουταθειόνης 10 μ mol/L.

3.2.5.γ Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης στο δείγμα εκφράζεται ως nmol της GSSG ανά mg πρωτεΐνης του δείγματος. Ως δείκτης εκτίμησης οξειδωτικού στρες προσδιορίστηκε και ο λόγος GSH/GSSG. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmol GSSG / mg πρωτεΐνης} = [((A_{\delta} - A_0) \times 0.75) / (A_{\pi} - A_0) \times 100] / 2 / C_{\delta}$$

A_{δ} : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0 : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

A_{π} : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του πρότυπου δείγματος.

Τιμή 0,75: Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης του πρότυπου δείγματος μ mol/L (nmol/mL).

Τιμή 100: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ. αντίδρασης}} / \mu\text{L αιωρήματος}$ [1000 μ L / 10 μ L]).

Τιμή 2: Ωστε να συνυπολογιστεί η στοιχειομετρία της αντίδρασης οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης ($2 \text{ GSH} \rightarrow 1 \text{ GSSG}$).

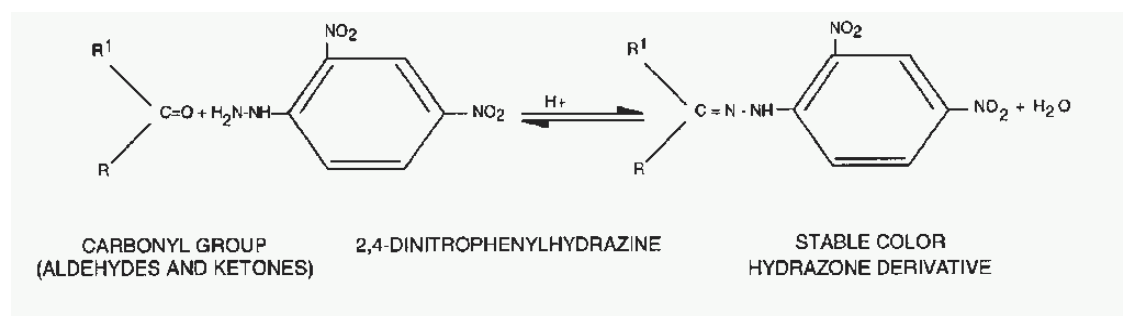
C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/mL πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

3.2.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά

3.2.6.α Αρχή της μεθόδου

Κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών, οι πλευρικές αλυσίδες των αμινομάδων μετατρέπονται σε καρβονύλια. Η καρβονυλίωση οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Οι μερικώς καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα, εάν όμως οι βλάβες που έχουν υποστεί είναι σημαντικές, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται σχηματίζοντας συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.

Για τον προσδιορισμό των καρβονυλίων χρησιμοποιείται το 2,4-δινιτροφαινυλο-υδραζίνη (DNPH), το οποίο αντιδρά με τα καρβονύλια και σχηματίζει βάσεις Schiff για την παραγωγή του υδραζόνιου το οποίο μπορεί να αναλυθεί με φασματοφωτομετρία μετρώντας την απορρόφηση μεταξύ 360-385 nm.



Εικόνα 18: Σύνδεση πρωτεΐνης με DNPH και σχηματισμός υδραζόνιου.

3.2.6.β Πειραματικό πρωτόκολλο

1. 200 μ L 20% TCA προστίθενται σε 200 μ L κυτταροπλασματικού αιωρήματος (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του).
2. Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C.
3. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500 μ L DNPH 10 mM (διαλυμένο σε 2,5N HCL) για τα δείγματα ή 500 μ L 2,5N HCL για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία

δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 min και στο τέλος φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 min στους 4°C.

4. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 min στους 4°C.
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 min στους 4°C.
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρωση στα 15000 g για 5 min στους 4°C.
7. Το βήμα 6 επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές.
8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
9. Προστίθενται 1 mL 5M ουρίας (pH 2,3) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15 min.
10. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15000 g για 3 min στους 4°C και μέτρηση της απορρόφησης στα 375nm.

3.2.6.γ Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DNPH. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{nmol PC / mg πρωτεΐνης} = [(A_s - A_0) / 0,022 \times 5] / C_s.$$

A_s sample: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0 blank: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

$\epsilon_{375}^{\text{DNPH}}$ (nmol/mL): 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH

Τιμή 5: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος $V_{\text{τελ. αντίδρασης}} / \mu\text{L πλάσματος [1000 } \mu\text{L / 200 } \mu\text{L]})$.

C₈: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

3.2.7 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm.⁷⁸

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 µg/mL. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 µL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 µL H₂O και 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 µL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

3.2.8 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η

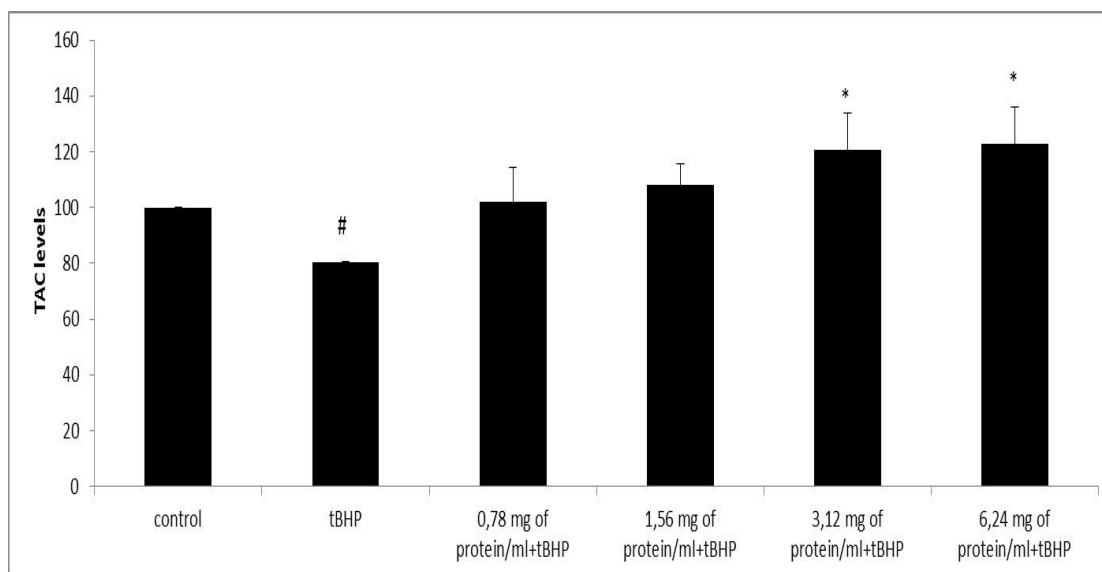
μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Tukey. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $P < 0,05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

4. Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά

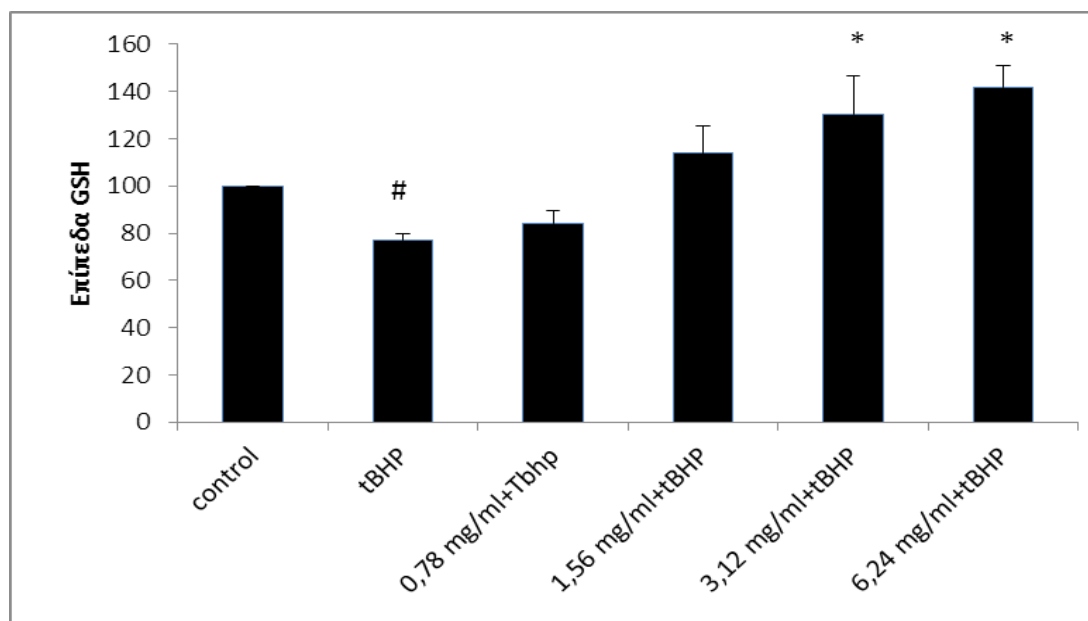
Τα επίπεδα της TAC στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 όταν χορηγήθηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH, μειώθηκαν σημαντικά κατά 19,45% σε σχέση με το control. Στα δείγματα που είχε προηγηθεί χορήγηση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν κατά 26,40%, 34,20%, 49,70% και 52,45%, σε σχέση με τα επίπεδα της TAC στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης/ml αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται στο **Γράφημα 1** τα επίπεδα της TAC στις συγκεντρώσεις 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης /mL αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με το δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH.



Γράφημα 1: Επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0,3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (0,3 mM) για 60 min. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

4.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά

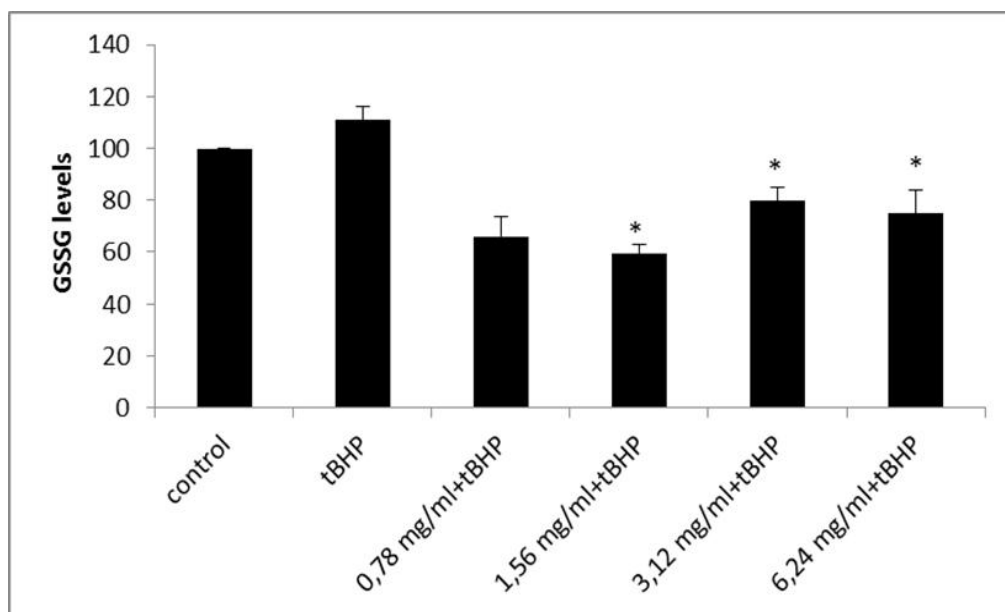
Τα επίπεδα της GSH στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα (t-BOOH) μειώθηκαν σημαντικά κατά 22,85% σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της GSH κατά 9%, 47,60%, 68,50% και 83,70% σε σχέση με τα επίπεδά της GSH στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης /mL αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 2** τα επίπεδα της GSH στις συγκεντρώσεις 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης /mL αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με το δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH.



Γράφημα 2: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0,3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (0,3 mM) για 60 min. # Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το control. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

4.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά

Τα επίπεδα της GSSG στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 μετά την χορήγηση του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH αυξήθηκαν κατά 11% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος τα επίπεδα της GSSG μειώθηκαν στατιστικώς σημαντικά κατά 40,48%, 46,65%, 28,10% και 32,50%, σε σχέση με τα επίπεδα της GSSG στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης /mL αντίστοιχα.



Γράφημα 3: Επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0,3 mM) για 1 h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) για 24 h + t-BOOH (0,3 mM) για 60 min. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

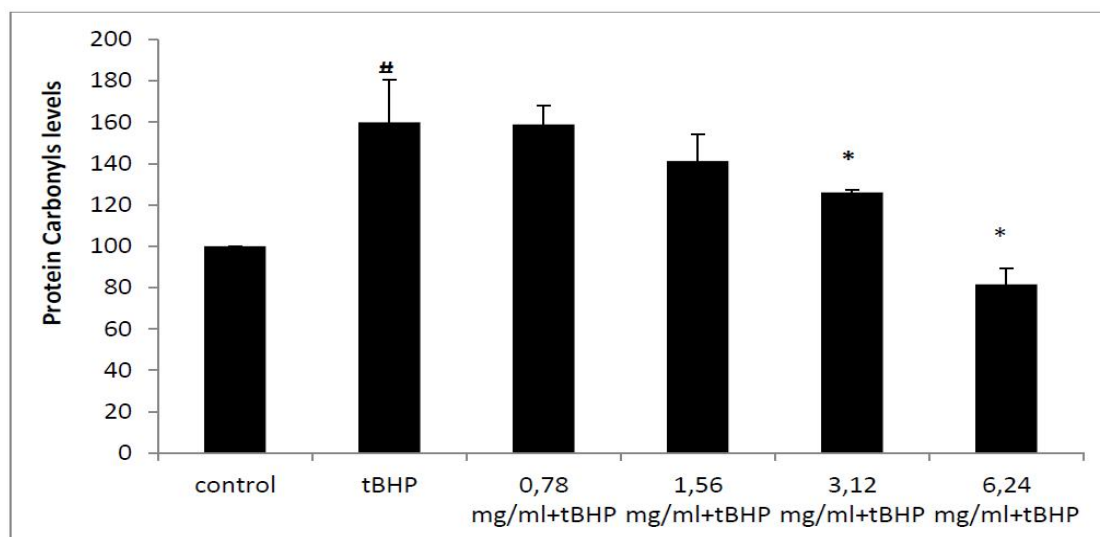
Όπως προαναφέραμε, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη στα κύτταρα χρησιμοποιείται συχνά σαν δείκτης της παρουσίας ελεύθερων ριζών και αποτελείται αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού.⁵²⁻⁵³ Στο **Γράφημα 4** παρουσιάζεται ο λόγος GSH/GSSG

Γράφημα 4: Επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ως προς τα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 σε όλα τα δείγματα.

4.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) σε κυτταρικό αιώρημα φασματοφωτομετρικά

Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 όταν χορηγήθηκε μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH, αυξήθηκαν σημαντικά κατά 60% σε σχέση με το control ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά 0,6%, 11,6%, 22% και 49% σε σχέση με τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις

συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης /mL αντίστοιχα. Σύμφωνα και με το **Γράφημα 5** τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις συγκεντρώσεις 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης /mL αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με το δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH.



Γράφημα 5: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) στην κυτταρική σειρά EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση μόνο t-BOOH (0,3 mM) για 1h και υπό τον συνδυασμό πρωτεΐνης ορού γάλακτος (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg/mL) για 24h + t-BOOH (0,3 mM) για 60 min. * Στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το δείγμα που προστέθηκε μόνο t-BOOH ($P < 0,05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

4. Συζήτηση

Σε έναν υγιή οργανισμό, η ισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών (προ-οξειδωτικά) και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών τείνει ελαφρά υπέρ των δραστικών μορφών έτσι ώστε να μπορούν να εκπληρώσουν τους βιολογικούς τους ρόλους. Περίπου το 1% των ROS ξεφεύγει από τον έλεγχο των ενδογενών αντιοξειδωτικών και αυτό το ποσοστό συνεισφέρει στην υπεροξειδική καταστροφή των περιβαλλόντων ιστών.⁷⁹ Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται “η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών παραγόντων και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ

των πρώτων’’.⁸⁰ Όταν υφίσταται το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα οι ελεύθερες ρίζες στην κυτταρική σειρά EA.hy926 (αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου), που είναι ιδιαίτερα ηλεκτρονιόφιλες, μπορούν να προσβάλουν μεγάλη ποικιλία πυρηνόφιλων μακρομορίων όπως φωσφολιπιδίων και γενικά λιπιδίων, αμινοξέων, νουκλεϊκών οξέων και υδατανθράκων.

Αναλυτικότερα, η υπεροξείδωση των λιπιδίων αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές και καλά μελετημένες εκδηλώσεις οξειδωτικού στρες και των αλληλεπιδράσεων ελευθέρων ριζών στα κύτταρα. Πολλά από τα τελικά προϊόντα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (εποξειδία, κορεσμένες αλδεΐδες, ακόρεστες αλδεΐδες, αλκενάλες, κετόνες, ισοπροστάνες και η μαλονική διαλδεΐδη – MDA) ή μεταβολικά παράγωγά τους είναι εξαιρετικά τοξικά και ευθύνονται για μεγάλο μέρος των βιοφυσικών και βιοχημικών διαταραχών που αποτελούν επακόλουθο της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Επίσης, η οξείδωση που υφίστανται οι πρωτεΐνες εξαιτίας του οξειδωτικού στρες οδηγούν σε παραγωγή καρβονυλίων, με αποτέλεσμα την απώλεια της δραστηριότητάς τους. Και τέλος, οι ελεύθερες ρίζες επιδρούν αρνητικά και στο DNA καθώς υδροξυλιώνουν τις αζωτούχες βάσεις και οδηγούν σε αποδιάταξη των κλώνων του DNA, όπου μη επιδιόρθωση μπορεί να επιφέρει μεταλλάξεις ή αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και νουκλεοτιδίων.

Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις όπως καρδιαγγειακή νόσος, καρκίνος, νευρολογικές διαταραχές, σακχαρώδη διαβήτη, ισχαιμία/επαναιμάτωση καθώς και στην γήρανση. Λόγω της πληθώρας ασθενειών στις οποίες εμπλέκονται οι ελεύθερες ρίζες αντιλαμβανόμαστε την σημαντικότητα του ρόλου των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Επειδή, οι φυσικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι ανεπαρκείς, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η παροχή αντιοξειδωτικών μέσω διατροφικών συστατικών.

Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος αποτελεί το σύνολο των πρωτεϊνών που παραμένουν στην υγρή φάση κατά τη διάρκεια της παρασκευής του τυριού μετά την καθίζηση της καζεΐνης του γάλακτος και χαρακτηρίζεται ως ένα βιολειτουργικό τρόφιμο. Τα εκχυλίσματα της πρωτεΐνης που προέρχονται από τον ορό γάλακτος αποτελούν συμπληρώματα της διατροφής των αθλητών. Τα εκχυλίσματα αυτά αποτελούν πρωτεϊνικά συμπληρώματα υψηλής βιολογικής αξίας και ενισχύουν τη σωματική

απόδοση.⁸¹⁻⁸³ Περιέχουν υψηλή συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας όπως λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη. τα οποία αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην υπερτροφία των μυών, στην αύξηση της δύναμης, καθώς και στην ανάπτυξη και επιδιόρθωση των ιστών. Η λευκίνη έχει αναγνωριστεί ως το αμινοξύ-κλειδί κατά τη διαδικασία έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης.⁶⁸

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή μελετήσαμε την αντιοξειδωτική δράση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος στις διάφορες συγκεντρώσεις της (0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης/ml) απέναντι στο προκαλούμενο από τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH οξειδωτικό στρες στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926, όπου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίσαμε με φασματοφωτομετρία τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) πριν και μετά την χορήγηση της πρωτεΐνης τυρογάλακτος, για να ελέγξουμε τις ευεργετικές της ιδιότητες ως προς τα επίπεδα των προαναφερθέντων δεικτών.

Η γλουταθειόνη, η πιο άφθονη πηγήθειόλης στα κύτταρα, αποτελεί ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό που προστατεύει από το οξειδωτικό στρες, καθώς στην ανηγμένη της μορφή μπορεί να προσφέρει ένα πρωτόνιο του σουλφυδικού δεσμού της και έτσι να αναχαιτίσει τη δράση των ROS. Η γλουταθειόνη λόγω των κατάλοιπων κυστεΐνης οξειδώνεται μη ενζυμικά σε οξειδωμένη γλουταθειόνη από ηλεκτρονιόφιλες ουσίες. Όταν λάβει χώρα η οξειδωσή της, δημιουργείται ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ δυο μορίων οξειδωμένης γλουταθειόνης, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται οξειδωμένη γλουταθειόνη, όπου το υψηλό ενδοκυτταρικό ποσοστό GSH/GSSG εξασφαλίζει τη βέλτιστη προστασία των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες προκαλούμενες από το οξειδωτικό στρες. Η εκροή από το κύτταρο της GSSG συμβάλει στην απώλεια της ενδοκυτταρικής GSH.⁸⁴ Τα επίπεδα της GSH μειώνονται σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες.⁸⁵ Προκειμένου να εξασφαλίζεται ενδοκυτταρικά αυτό το υψηλό ποσοστό, λαμβάνουν χώρα δυο κυτταρικοί μηχανισμοί. Ο ένας λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) όπου μειώνεται το ποσοστό της GSSG προς της ενεργή μορφή της GSH και ο δεύτερος λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης και της συνθετάσης της γλουταθειόνης (GPx). Προκειμένου

να επιτευχθεί ενδοκυτταρικά η σύνθεση της GSH είναι απαραίτητο να επαρκούν οι ποσότητες των αμινοξέων του γλουταμικού οξέος, της κυστεΐνης και της γλυκίνης.

Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της GSH παρουσιάστηκαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα της GSH στα κύτταρα που επώαστηκαν με τον οξειδωτικό παράγοντα t-BOOH κατά 22,85% συγκριτικά με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε η χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρουσιάστηκαν αυξημένα επίπεδα GSH κατά 9%, 47,60%, 68,50% και 83,70% σε σχέση με τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης/mL αντίστοιχα. Συνεπώς, παρατηρείται σημαντική αύξηση της GSH στα δείγματα που επώαστηκαν με την πρωτεΐνη ορού γάλακτος. Τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνονται και από προηγούμενες μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε βρέθηκε ότι η χορήγηση 0,5 mg/mL πρωτεΐνης ορού γάλακτος σε μυοβλάστες ποντικού (κυτταρική σειρά C2C12), υπό την επίδραση διαφορετικού οξειδωτικού παράγοντα (H_2O_2) οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της GSH κατά 70% σε σχέση με την χορήγηση μόνο H_2O_2 .⁸⁶ Σε μια άλλη έρευνα, επώαση με πρωτεΐνη ορού γάλακτος (90% περιεκτικότητα) αυξάνει τα επίπεδα της GSH στην κυτταρική σειρά PC12 (προέρχονται από μυελό επινεφριδίων ποντικού) έπειτα από επαγωγή οξειδωτικού στρες από αιθανόλη κατά 22% για συγκέντρωση πρωτεΐνης 1mg/mL και κατά 73,8% για συγκέντρωση 10mg/mL.⁸⁷ Ακόμα, μια μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση 0.5mg/mL υδρολυμένης πρωτεΐνης ορού γάλακτος (90,5% περιεκτικότητα) σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προστάτη αυξάνει τα επίπεδα της GSH κατά 64%.⁸⁸

Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της GSH ενδέχεται πιθανότατα να οφείλεται στην αυξημένη παροχή υποστρωμάτων (κυρίως της αλβουμίνης, της λακτοφερίνης και της α-λακταλβουμίνης), που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα κύτταρα με αποτέλεσμα να επάγεται η ενδογενής παραγωγή γλουταθειόνης. Συγκεκριμένα, η επίδραση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος στα επίπεδα της GSH σχετίζεται με την υψηλή περιεκτικότητα των εν λόγω υποστρωμάτων σε κυστεΐνη. Η κυστεΐνη είναι ένα από τα τρία αμινοξέα της GSH και καθορίζει το ρυθμό βιοσύνθεσής της, καθώς υπάρχει ανταγωνισμός για τη χρήση της κυστεΐνης είτε για την παραγωγή GSH είτε για την πρωτεϊνοσύνθεση, με την τελευταία να ευνοείται όταν τα επίπεδα των αμινοξέων στο κύτταρο είναι χαμηλά. Συνεπώς, εάν μέσω της διατροφής ληφθεί μια πρωτεΐνη που είναι πλούσια σε κυστεΐνη, όπως η πρωτεΐνη

ορού γάλακτος, τότε θα επαχθεί η βιοσύνθεση της GSH. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος πιθανώς να επάγουν την σύνθεση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, η οποία καταλύει την αντίδραση μετατροπής της GSSG σε GSH, αναγεννώντας έτσι την τελευταία.

Ακόμη, προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά τα επίπεδα της GSSG και παρατηρήθηκε αύξησή τους στο δείγμα που είχε χορηγηθεί μόνο ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH κατά 11% σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε η χορήγηση της αιγοπρόβειας πρωτεΐνης ορού γάλακτος παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της GSSG κατά 40,48%, 46,65%, 28,10% και 32,50% συγκριτικά με τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης/mL αντίστοιχα. Η μείωση που προκάλεσε η πρωτεΐνη ορού γάλακτος στα επίπεδα της GSSG δικαιολογείται από τα αυξημένα επίπεδα της GSH, καθώς η γλουταθειόνη βρίσκεται στα κύτταρα τόσο στην ανηγμένη (GSH) όσο και στην οξειδωμένη (GSSG) μορφή της και μεταξύ τους συμβαίνει μια αντίδραση ανακύκλωσης. Παρουσία της αναγωγάσης της γλουταθειόνης πραγματοποιείται η αντίδραση μετατροπής της GSSG σε GSH και μέσω της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης καταλύεται η μετατροπή της GSH σε GSSG. Όπως αναφέρεται και παραπάνω η πρωτεΐνη ορού γάλακτος φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα του ενζύμου αναγωγάσης της γλουταθειόνης με αποτέλεσμα την αναγέννηση της GSH από την GSSG και κατ' επέκταση την μείωση των επιπέδων της τελευταίας. Επίσης, η μείωση που προκάλεσε η πρωτεΐνη ορού γάλακτος στα επίπεδα της GSSG μπορεί να οφείλεται και στην αντιοξειδωτική ικανότητα της πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Μελέτες του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα ελεύθερες ρίζες, καθώς και να μειώνει τα επίπεδά τους με ενίσχυση αντιοξειδωτικών μηχανισμών σε κύτταρα EA.hy926 και σε μυϊκά κύτταρα.⁸⁹

Η οξείδωση των πρωτεϊνών οδηγεί στην παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC), τα οποία με την σειρά τους οδηγούν σε απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρώτων και του τρόπου που λειτουργούν άλλα βιομόρια. Κατά τον προσδιορισμό των επιπέδων των PC παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων τους παρουσία μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH κατά 60% σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος τα επίπεδα των

PC μειώθηκαν κατά 40,48%, 46,65%, 28,10% και 32,50% συγκριτικά με τα επίπεδα τους στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης/mL αντίστοιχα. Ο οξειδωτικός παράγοντας t-BOOH αντιδρά με Fe^{2+} σχηματίζοντας ρίζες τριτ-βούτυλ-υδροπεροξυλίου (tBO \cdot), οι παραγόμενες ρίζες tBO \cdot μπορούν να οδηγήσουν σε οξείδωση των πρωτεϊνών με δυο τρόπους, είτε απευθείας από την επίθεση των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων είτε έμμεσα οδηγώντας σε λιπιδική υπεροξείδωση. Τα παραπροϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης αποτελούν έναν από τους παράγοντες που οδηγούν σε πρωτεϊνική οξείδωση, έτσι εξηγείται η σημαντική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρουσία μόνο του t-BOOH κατά 60%.⁹⁰⁻⁹¹ Η χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων των PC έως 46,65%. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από μια άλλη μελέτη που έδειξε ότι στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η πρωτεΐνη ορού γάλακτος σε συγκέντρωση 0,5mg/mL αναστέλλει τα αυξημένα επίπεδα MDA, έναν δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης.⁸⁶

Τέλος, με φασματοφωτομετρική μέτρηση προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και βρέθηκε ότι παρουσία μόνο του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH τα επίπεδα της TAC μειώνονται σημαντικά κατά 19,45% σε σχέση με το control, ενώ στα δείγματα που προηγήθηκε η χορήγηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν κατά 26,40%, 34,20%, 49,70% συγκριτικά με τα επίπεδα τους στο δείγμα που χορηγήθηκε μόνο t-BOOH, για τις συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,12 και 6,24 mg πρωτεΐνης/mL αντίστοιχα. Η TAC αποτελεί έναν δείκτη μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ξεχωριστά κάθε αντιοξειδωτικό συνεισφέρει διαφορετικά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η βιταμίνη C και E αντιπροσωπεύουν το ένα τέταρτο της TAC. Η σημαντική αύξηση των επιπέδων της TAC ενδεχομένως να οφείλεται και στην αύξηση των επιπέδων της GSH, η οποία συμβάλει στην διατήρηση των εξωγενών αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη C και E, στην ανηγμένη (ενεργή) μορφή τους.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα παρούσας έρευνας έδειξαν πως η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση πιθανώς λόγω του πλούσιου περιεχομένου της σε κυστεΐνη, η οποία αυξάνει την συγκέντρωση της γλουταθειόνης. Οι μετρήσεις έδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας με παράλληλη μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και κατ' επέκταση μείωση της πρωτεϊνικής οξείδωσης.

Συνεπώς, η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη ορού γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό σε βιολειτουργικά τρόφιμα ή ως διατροφικά συμπληρώματα που συμβάλουν στην ενίσχυση της σωματικής απόδοσης ή και ακόμη στην πρόληψη ή αντιμετώπιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Ωστόσο, είναι αναγκαίο να εκπονηθούν περαιτέρω έρευνες προκειμένου να αναλυθεί διεξοδικότερα ο ακριβής μηχανισμός δράσης και τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην άσκηση των αντιοξειδωτικών δράσεων της πρωτεΐνης ορού γάλακτος.

Βιβλιογραφία

1. Zsolt Radak., Free radicals in aging and exercise, 2003.
2. Halliwell B., Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, 2001. Encyclopedia of Life Science.
3. Halliwell B. & Gutteridge JMC, (eds)., Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford, 1997.
4. Δημήτριος Γαλλάρης., Ελεύθερες ρίζες: Χημεία – Βιοχημεία.
5. Χριστίνα Κωστάρα., Τι είναι οι ελεύθερες ρίζες και γιατί απειλούν την υγεία μας. 2011.
6. Groff L. James, Gropper S. Sareen, Hunt M. Sara., Advanced nutrition and human metabolism.
7. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer., Βιοχημεία, Τόμος I: κεφάλαιο 18 – οξειδωτική φωσφορλίωση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
8. Arora A., Sairam R.K. & Srivasta G.C., Oxidative stress and antioxidative system in plants, 2002. Curent Science, vol. 82, no. 10, pp. 1227-1238.
9. Turrens J.F., Mitochondrial formation of reactive oxygen species, 2003. Journal of Physiology, vol. 552, no. 2, pp. 335-344.
10. Murphy M.P., How mitochondria produce reactive oxygen species, 2009. Biochemical Journal, vol. 417, no. 1, pp. 1-13.
11. Nohl H., Jordan W., The mitochondrial site of superoxide formation, 1986. Biochem Biophys Res Commun, 1366 (1-2): 53-67.
12. Kuppasamy P. & Zweier J.L., Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation, 1989. J Biol Chen 264:9880-9884.
13. Downey J.M., Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion, 1990. Annu Rev Physiol 52:487-504.
14. Ian Todd & Gavin Spickett., Ανασολογία, Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης: Μαρία Κοντού, 5^η έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Α.Ε.

15. Katsuhiko Suzuki, Shigeyuki Nakaji, Mutsuo Yamada, Qiang Liu, Shigeyoshi Kurakake., Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses, 2003. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 0195-9131/03/3502-1348.
16. Karol A. Kaminski Tomaz A. Bonda, Janusz Korecki, Włodzimierz J Musiał., Oxidative stress and neutrophil activation – the two keystones of ischemia/reperfusion injury, 2002. *International Journal of Cardiology* 86 41-59.
17. Yu BP., Cellular defences against damage from reactive oxygen species, 1994. *Physiol Rev* 74: 139-162.
18. Chance B., Sies H. & Boveris A., Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, 1979. *Physiol Rev* 59: 527-605.
19. Halliwell B. & Gutteridge JMC., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1989. 11: 416-493, 188-266.
20. Rav RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK, Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics, 2001. *Drug Chem Toxicol* 24: 191-200.
21. Maria L. Urso, Priscilla M. Clarkson, Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, 2003. *Toxicology* 189 41-54.
22. Leaf, DA. et. al. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation, 1997. *Med. Sci. Sports Exercise* 29 (8), 1036-1039.
23. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P, Redox state of glutathione in human plasma, 2000. *Free Radic Biol Med* 28: 625-635.
24. Ames BN, Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens, 1986. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.
25. Valko M., Rhodes C.J., MOncol J., Izakovic M. & Mazur M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, 2006. *Chem Biol Interact*, 160: 1-40.
26. Kiriln WG, CAI J. Thompson SA, Diaz D, Kavanagh TJ & Jones DP, Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers, 1999. *Free Radic Biol Med*, 27: 1208-1218.

27. Lee J., Godon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J. et al. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast, 1999. *J Biol Chem*, 274: 16040-16046.
28. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu J, Sorescu et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1, 1999. *Nature (London)*, 401: 79-82.
29. Lee SJ, Yang ES, Kim SY, Kim SY, Shin SW, Park JW, [Regulation of heat shock-induced apoptosis by sensitive to apoptosis gene protein](#), 2008. *Free Radic Biol Med.*, 45: 167-176.
30. Peake J, Nosaka K, Suzuki K, [Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans.](#), 2005. *Exerc Immunol Rev.*, 11: 64-85.
31. [Plant DR](#), [Gregorevic P](#), [Williams DA](#), Redox modulation of maximum force production of fast-and slow-twitch skeletal muscles of rats and mice., 2001. *J Appl Physiol.*, 90: 832-838.
32. Zhang SJ, Bruton JD, Katz A, Westerblad H, [Limited oxygen diffusion accelerates fatigue development in mouse skeletal muscle.](#), 2006. *J Physiol.*, 572: 551-559.
33. Klatt P. & Lamas S., Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress, 2000. *Eur J Biochem*, 267: 4928-4944
34. Ames BN, Shingenaga MK, Park EM, DNA damage by endogenous oxidants as a cause of ageing and cancer. In: Davies KJA (ed) *Oxidative damage and repair: Chemical, medical and biological aspects*. Pergamon Press, New York, 1991: 181-187.
35. Surai OF, *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*, 2002. Nottingham University Press, Nottingham, UK: 233-304.
36. Droge W., Free Radicals in the physiological control of cell function, 2002. *Physiol Rev*, 82: 47-95.
37. Levine R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. 2002. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 790-796.
38. Levine R.L., Moskovitz J., Stadtman E.R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. 2000. *Intl. Union Biochem. Mole. Biol. Life.* 50: 301-307.

39. Szweda P.A., Friguet B., Szweda L.I. Proteolysis, free radicals and aging. 2002. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 29-36.
40. Fedtke N, Boucheron JA, Walker VE & Swenberg JA, Vinyl chloride-induced DNA adducts. 2. Formation and persistence of 7-2'-oxoethylguanine and N², 3-ethenoguanine in rat-tissue DNA, 1990. *Carcinogenesis*, 11: 1287-1292.
41. Fink SP, Reddy GR & Marnett LJ., Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde, 1997. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 8652-8657.
42. Mao H, Schnetz-Boutaud NC, Weisenseel JP, Marnett LJ & Stone MP, Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct, 1999. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 6615-6620.
43. Marnett LJ, Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde, 1999. *Mut Res Funt Mol Mech Mutagen*, 424: 83-95.
44. Wang MY, Dhingra K, Hittelman WN, Liehr JG, De Andrade M, Li DH, lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde- DNA adducts in human breast tissues, 1996. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5: 705-710.
45. Halliwell B & Gutteridge JM, *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition, 1999. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
46. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA, Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals, 2007. *Physiol Rev*, 87: 1175-1213.
47. Kastan MB & Bartek J, Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004, 432: 316-323.
48. Powers SK & Lennon SL, Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle, 2000. *Proc Nutr Soc*, 58: 1025-1033.
49. Das KC, Lewis-Molock Y. & White CW, Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin, 1997. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 713-726.
50. Antunes F., Derick H. & Cadenas E., Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in vivo conditions, 2002. *Free Radic Biol Med*, 33 (9): 1260-1267.

51. Jenkins RR & Goldfarb A, Introduction: oxidant stress, aging and exercise, 1993. Med Sci Sport Exerc, 25 (2): 210-212.
52. Jamieson DJ, Oxidative stress responses of the yeast *saccharomyces cerevisiae*, 1998. Yeast, 14:1511-1527.
53. Κουρέτας Δ. & Στάγκος Δ., Εργαστηριακές Σημειώσεις Βιοχημικής Τοξικολογίας.
54. Masella R, DI Benedettor R, Vari R, Filesi C. & Giovannini C, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, 2005. J Nutr Biochem, 16: 577-586.
55. Arrigo AP, Gene expression and the thiol redox state, 1999. Free Radic Biol Med, 27: 936-944.
56. Pastore A, Federici G, Bertini E. & Piemonte F, Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification, 2003. Clin Chim Acta, 333: 19-39.
57. Griffiths HR & Lunec J, Ascorbic acid in the 21st century – more than a simple antioxidant, 2001. Environ Toxicol Pharmacol, 10: 173-182.
58. Fang YZ, Yang S & Wu GY, Free radicals, antioxidants and nutrition, 2002. Nutrition, 18: 872-879.
59. Halliwell B, Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo, 1996. Free Rad Res, 25: 439-454.
60. Buettner GR, The pecking order of free-radicals and antioxidants – Lipid-peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate, 1993. Arch Biochem Biophys, 300: 535-543.
61. Richter C, Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes, 1987. Chem Phys Lipids, 44: 175-189.
62. Gutteridge JM, Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, 1995. Chem. Phys Lipids, 44: 175-189.
63. Edge R, McGarvey DJ & Truscott Tg, The carotenoids as antioxidants – A review, 1997. J Photochem Photobiol B, 41: 189-200.
64. Ozhogina OA & Kasaikina OT, β -carotene as an interceptor of free radicals, 1995. Free Radical Biol Med, 18: 401-409.

65. Halliwell B, Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? 2008. Arch Biochem Biophys. 476: 107-112.
66. Wayner DDM, Burton GM, Ingold KU, et al., The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma, 1987. Biochim Biophys Acta, 924: 408-19.
67. Marklund N, Ostman B, Nalmo L, et. al., Hypoxanthine, uric acid and allantoin as indicators of in vivo free radical reactions: description of a HPLC method and human brain microdialysis data, 2000. Acta Neurochir (Wien), 142: 1135-1142.
68. Ευθαλία Κερασιώτη, Αλέξανδρος Πρίφτης, Στέφανος Αϊβαζίδης, Δημήτριος Στάγκος, Δημήτριος Κουρέτας, Μελέτη Της Αντιοξειδωτικής Δράσης Της Αιγοπρόβειας Πρωτεΐνης Τυρογάλακτος in vitro & Στην Κυτταρική Σειρά C₂C₁₂, Αθήνα, Οκτώμβριος 2013.
69. Walzem R.L., Dillard C.J., German J.B., Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking, 2002. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42: 353-375.
70. Parodi P. W., Aroledormilkproteinsndtheirpeptidesincancerprevention, CurrentPharmaceuticalDesign, 13, 8, 813-828, 2007.
71. Sies H., Summer K.H., Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver, 1975. Eur. J. Biochem 57: 503-512.
72. Alia M., Ramos S., Bravo L., Goya L., Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2), 2005. J. Biochem Mol. Toxicol. 19: 119-127.
73. Lima C.F., Femandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C., Phenolic compounds protect HepG2 Cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels, 2006. Life Sci. 79: 2056-2068.
74. Martin ., Martinez P., Navarro R., Ruiz-Sanz J.I., Lacort M., Ruiz-Larrea M.B., Tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals, 2000. BIOCHEM Pharm 62: 705-712.
75. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB., [Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization](#), 1983. Proc Natl Acad Sci U S A., 80: 3734-3737.
76. Janaszewska, A., Bartosz, G., Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma, 2002. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 62: 231-236.

77. Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C., Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients, 2004. Indian J. Tuberc. 51: 213–218.
78. Bradford MM., A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding., 1976. Anal Biochem., 72: 248-254.
79. Mette M. Berger, Can oxidative damage be treated nutritionally? 2005. Clinical Nutrition, 24: 172-183.
80. Halliwell B., Biochemistry of oxidative stress, 2007. Biochem Soc Trans., 35: 1147-50.
81. Dragan I., Stroescu V., Stoian I., Georgescu E., Baloescu R., Studies regarding the efficiency of Supro isolated soy protein in Olympic athletes, 1992 Rev. Roum. Physiol. 29: 63–70.
82. Markus C.R., Olivier B., de Haan, E.H., Whey protein rich in alphas-lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects, 2002. Am. J. Clin. Nutr. 75: 1051–1056.
83. Bartfay W.J., Davis M.T., Medves J.M., Lugowski S., Milk whey protein decreases oxygen free radical production in a murine model of chronic iron overload cardiomyopathy, 2003. Can. J. Cardiol. 19: 1163–1168.
84. Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N. D. Glutathione metabolism and its implications for health, 2004. J. Nutr. 134: 489–492.
85. Lu S.C., Regulation of glutathione synthesis, 2000. Curr. Top. Cell Regul. 36: 95-116.
86. Xu R., Liu N., Xu X., Kong B., Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity, 2011. J. Dairy Sci. 94: 3739–3746.
87. Tseng Y.M., Lin S.K., Hsiao J.K., Chen I J., Lee J.H., Wu S.H., Tsai L.Y., Whey protein concentrate promotes the production of glutathione (GSH) by GSH reductase in the PC12 cell line after acute ethanol exposure, 2006. Food Chem.Toxicol. 44: 574–578.
88. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA, Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells, 2003. Toxicol In Vitro 17: 27-33.
89. Κερασιώτη Ευθαλία, Διδακτορική διατριβή: Επίδραση της χορήγησης σκευάσματος υδατανθράκων-πρωτεϊνών σε δείκτες οξειδωτικού στρες, φλεγμονής και υποξίας μετά από άσκηση σε ανθρώπους, Λάρισα 2014. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

90. Kim J.G., Sabbagh F., Santanam n., Wilcox J.N., Medford R.M., Parthasarathy S.,
Generation of a polyclonal antibody against lipid peroxide-modified proteins, 1997.
Free Radic. Biol. Med. 23: 251-259.
91. Hix S., Kadisiska M.B., Mason R.P., Augusto O., *In vivo* metabolism of *tert*-butyl
hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies.,
2000. Chem. Res. Toxicol. 13: 1056-1064.